



**You have downloaded a document from
RE-BUS
repository of the University of Silesia in Katowice**

Title: Porównanie i ocena skuteczności wybranych narzędzi metabonomicznych w analizie widm protonowych spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego

Author: Łukasz Boguszewicz

Citation style: Boguszewicz Łukasz. (2013). Porównanie i ocena skuteczności wybranych narzędzi metabonomicznych w analizie widm protonowych spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego. Praca doktorska. Katowice : Uniwersytet Śląski

© Korzystanie z tego materiału jest możliwe zgodnie z właściwymi przepisami o dozwolonym użytku lub o innych wyjątkach przewidzianych w przepisach prawa, a korzystanie w szerszym zakresie wymaga uzyskania zgody uprawnionego.



UNIwersYTET ŚLĄSKI
W KATOWICACH



Biblioteka
Uniwersytetu Śląskiego



Ministerstwo Nauki
i Szkolnictwa Wyższego

Uniwersytet Śląski
Wydział Matematyki, Fizyki i Chemii
Instytut Fizyki im. Augusta Chełkowskiego

**Porównanie i ocena skuteczności wybranych
narzędzi metabonomicznych w analizie widm
protonowych spektroskopii magnetycznego
rezonansu jądrowego**

Łukasz Boguszewicz

Praca doktorska
Wykonana w Centrum Onkologii – Instytut
im. Marii Skłodowskiej-Curie
Oddział w Gliwicach

Promotor: **Prof. dr hab. n. med. Maria Sokół**

GLIWICE 2013

Podziękowania

Pragnę podziękować wszystkim osobom, bez których napisanie niniejszej pracy nie byłoby możliwe.

Dziękuję pani Promotor – prof. dr hab. n. med. Marii Sokół za ogromną cierpliwość i szereg cennych uwag.

Dziękuję również dr Sławomirowi Blamkowi, mgr Agnieszce Skorupie.

Pracę tę dedykuję mojej żonie i synowi.

Spis treści

	<i>Spis treści</i>	3
	Objaśnienie najważniejszych skrótów	6
1	Wstęp	8
2	¹H MRS jako narzędzie w diagnostyce klinicznej	9
2.1	<i>Wprowadzenie</i>	9
2.2	<i>Neurometabolity</i>	10
2.2.1	N-acetylo asparaginian (NAA)	11
2.2.2	Kreatyna (Cr) i fosfokreatyna (PCr)	11
2.2.3	Związki cholinowe (tCho)	12
2.2.4	Mio-inozytol (mI)	13
2.2.5	Glutaminian (Glu) i glutamina (Gln)	13
2.2.6	Mleczan (Lac)	13
2.2.7	Lipidy (Lip)	14
2.2.8	Kwas γ – aminomasłowy (GABA)	14
2.2.9	Octan (Ace)	14
2.2.10	Alanina (Ala)	15
2.3	<i>Zastosowanie ¹H MRS in vivo i problem interpretacyjny</i>	15
3	Metabonomika	17
3.1	<i>Metabonomika oparta na spektroskopii in vitro</i>	17
3.2	<i>Metabonomika oparta na spektroskopii in vivo</i>	18
4	Podstawy teoretyczne spektroskopii NMR	21
4.1	<i>Podstawy fizyczne NMR</i>	21
4.1.1	Przesunięcie chemiczne	22
4.2	<i>Spektroskopia pojedynczego woksela</i>	24
4.2.1	Wy tłumienie sygnału wody	24
4.2.2	Określenie wymiarów i lokalizacja VOI	24
4.2.3	Akwizycja widma	25
5	Charakterystyka wybranych narzędzi metabonomicznych	27
5.1	<i>Analiza składowych głównych</i>	27
5.1.1	Model matematyczny PCA	27
5.1.2	Interpretacja geometryczna PCA	29
5.1.3	Jakość modelu PCA oraz liczba wyodrębnionych składowych głównych	31
5.1.4	Identyfikacja widm odstających	33

5.2	<i>Metoda cząstkowych najmniejszych kwadratów – analiza dyskryminacyjna</i>	33
5.2.1	Model matematyczny PLS-DA	34
5.2.2	Interpretacja geometryczna PLS-DA	36
5.2.3	Jakość modelu PLS-DA oraz liczba wyodrębnionych składowych ukrytych	37
5.2.4	Istotność zmiennych wejściowych	38
5.2.5	Ortogonalna korekcja sygnału	39
5.3	<i>Sztuczne sieci neuronowe, perceptron wielowarstwowy</i>	40
5.3.1	Nieliniowe funkcje aktywacji	41
5.3.2	Topologia MLP	41
5.3.3	Uczenie MLP	43
5.3.4	Jakość sieci neuronowej	47
5.3.5	Optymalizacja procesu uczenia sieci	48
5.3.6	Dobór istotnych zmiennych wejściowych	50
5.4	<i>Wstępna obróbka danych wejściowych do analizy</i>	51
6	Cel pracy	52
7	Wielowymiarowa analiza danych spektroskopowych	53
7.1	<i>Materiały i metody</i>	54
7.1.1	Dane spektroskopowe	54
7.1.2	Protokół MRS	56
7.1.3	Analizy wielowymiarowe	56
7.1.4	Klasyfikacja metodą sieci neuronowych	58
7.2	<i>Wyniki</i>	59
7.2.1	Detekcja widm odstających i sprawdzenie rozkładu danych wejściowych metodą PCA	59
7.2.2	Porównanie wyników PCA z danymi klinicznymi	62
7.2.3	Dyskusja	66
7.2.4	Analiza i grupowanie widm ^1H MRS metodą PLS-DA oraz PLS-DA z filtrowaniem OSC	68
7.2.4.1	Rozróżnienie widm ^1H MRS ze względu na przynależność do danej grupy histopatologicznej	68
7.2.4.2	Rozróżnienie widm ^1H MRS ze względu na przynależność do grupy wyznaczonej na podstawie badań kontrolnych	73
7.2.4.3	Rozróżnienie wczesnych i późnych powikłań po radioterapii na podstawie analizy widm ^1H MRS	76
7.2.4.4	Rozróżnienie widm ^1H MRS ze względu na metaboliczną odpowiedź na przeprowadzoną resekcję guza	78
7.2.4.5	Rozróżnienie widm ^1H MRS ze względu na metaboliczną odpowiedź na leczenie chemioterapią	80
7.2.4.6	Rozróżnienie widm ^1H MRS ze względu na stopień złośliwości nowotworu	82
7.2.4.7	Dyskusja	85

7.2.5	Analiza i grupowanie widm ^1H MRS metodą PLS-DA z filtrowaniem OSC z rozróżnieniem na lokalizację obszaru pomiarowego	92
7.2.5.1	Porównanie rozróżnienia widm ^1H MRS ze względu na przynależność do danej grupy histopatologicznej w zależności od lokalizacji obszaru pomiarowego	92
7.2.5.2	Porównanie rozróżnienia widm ^1H MRS ze względu na przynależność do grupy wyznaczonej na podstawie badań kontrolnych w zależności od lokalizacji obszaru pomiarowego	95
7.2.5.3	Rozróżnienie wczesnych i późnych powikłań po radioterapii na podstawie analizy widm ^1H MRS dla poszczególnych lokalizacji obszaru pomiarowego	97
7.2.5.4	Ocena odpowiedzi tkanki mózgu na przeprowadzoną resekcję guza na podstawie analizy widm ^1H MRS z uwzględnieniem lokalizacji obszaru pomiarowego.....	100
7.2.5.5	Metaboliczna odpowiedź na chemioterapię – rozróżnianie widm ^1H MRS z uwzględnieniem lokalizacji obszaru pomiarowego	102
7.2.5.6	Rozróżnienie widm ^1H MRS ze względu na stopień złośliwości nowotworu z uwzględnieniem lokalizacji obszaru pomiarowego	105
7.2.5.7	Rozróżnienie widm ^1H MRS ze względu na lokalizację obszaru pomiarowego	107
7.2.5.8	Dyskusja	109
7.2.6	Klasyfikacja widm ^1H MRS metodą sieci neuronowych	118
7.2.6.1	Klasyfikacja po redukcji wymiarów zmiennych wejściowych metodą PCA	120
7.2.6.2	Klasyfikacja po redukcji wymiarów zmiennych wejściowych algorytmem BFS	129
7.2.6.3	Porównanie zdolności klasyfikacyjnych sieci MLP w zależności od wybranej metody redukcji wymiaru zmiennych wejściowych	135
7.2.6.4	Dyskusja	136
7.3	Wnioski	142
8	Podsumowanie	144
9	Załącznik	145
10	Bibliografia	148
11	Spis rysunków	165
12	Spis tabel	168
13	Publikacje	171

Objaśnienie najważniejszych skrótów

¹ H	jądro wodoru, proton
Ace	octan
Ala	alanina
ANN	sztuczna sieć neuronowa (ang. <i>artificial neural network</i>)
ASTR	astrocytoma
BCG	brak cech guza
BFS	wsteczny dobór cech (ang. <i>backward feature selection</i>)
CHT	chemioterapia
DSS	system wspomagający decyzję (ang. <i>decision support system</i>)
EP	ependymoma
EBP	wsteczna propagacja błędu (ang. <i>error backpropagation</i>)
GABA	kwas γ – aminomasłowy
GBM	glioblastoma
GR	lokalizacja obszaru zainteresowania na granicy guza lub łoża pooperacyjnej i tkanki zdrowej
Glx	glutaminian + glutamina
HM	hemangioblastoma
K-W	test Kruskala-Wallisa
Lac	mleczan
LC	składowa ukryta (ang. <i>latent component</i>)
LDA	liniowa analiza dyskryminacyjna (ang. <i>linear discriminant analysis</i>)
Lip	lipidy
MA	analiza wielowymiarowa (ang. <i>multivariate analysis</i>)
MD	medulloblastoma
mI	mio-inozytol
MLP	perceptron wielowarstwowy (ang. <i>multilayer perceptron</i>)
MRS	spektroskopia rezonansu magnetycznego (ang. <i>Magnetic Resonance Spectroscopy</i>)
NAA	N-acetylo-asparaginian
NMR	magnetyczny rezonans jądrowy (ang. <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
OSC	ortogonalna korekcja sygnału (ang. <i>orthogonal signal correction</i>)
OUN	ośrodkowy układ nerwowy
PC	składowa główna (ang. <i>principal component</i>)
PCA	analiza składowych głównych (ang. <i>principal component analysis</i>)
PLS-DA	metoda cząstkowych najmniejszych kwadratów – analiza dyskryminacyjna (ang. <i>partial least squares – discriminant analysis</i>)
PR	rozpoznawanie wzorca (ang. <i>pattern recognition</i>)
REF	lokalizacja obszaru zainteresowania w tkance zdrowej, odległej od miejsca zmiany nowotworowej
RT	radioterapia
tCho	związki choinowe
tCr	kreatyny + fosfokreatyna
TE	czas echa (ang. <i>time to echo</i>)
TR	czas repetycji (ang. <i>time to repeat</i>)
U M-W	test U Manna-Whitneya
VIP	istotność zmiennej (ang. <i>variable importance</i>)
VOI	obszar zainteresowania (ang. <i>volume of interest</i>)

Notacje w analizach wielowymiarowych

\mathbf{X}	macierz danych wejściowych, $(m \times n)$
\mathbf{Y}	zerojedynkowa macierz kodująca przynależność do danej klasy k $(m \times k-1)$
\mathbf{P}	macierz ładunków czynnikowych dla \mathbf{X} , $(n \times n)$
\mathbf{T}	macierz współrzędnych czynnikowych dla \mathbf{X} , $(m \times n)$
\mathbf{w}^*	wektor wag dla \mathbf{X}
t	współrzędna czynnikowa dla \mathbf{X}
p	ładunek czynnikowy dla \mathbf{X}
\mathbf{w}^*	waga dla \mathbf{X}
Q^2	suma kwadratów błędu predykcji dla wyodrębnionej składowej (zdolność predykcyjna)
$R^2\mathbf{X}$	suma kwadratów danych \mathbf{X} wyjaśniona przez wyodrębnione składowe główne lub składowe ukryte
$R^2\mathbf{Y}$	suma kwadratów danych \mathbf{Y} wyjaśniona przez wyodrębnione składowe ukryte
$R^2\text{OSC}$	suma kwadratów macierzy resztkowej OSC
λ	wartość własna macierzy kowariancji

Notacje w sztucznych sieciach neuronowych

e	pobudzenie neuronu
$F(e)$	funkcja aktywacji neuronu
NRMSE	znormalizowany pierwiastek z błędu średniokwadratowego (ang. <i>normalized root mean squared error</i>)
η	szybkość uczenia
T	zbiór testowy
T_{zew}	zewewnętrzny zbiór testowy
U	zbiór uczący
W	zbiór walidacyjny
w	waga na wejściu neuronu
x	sygnał wejściowy neuronu
y	sygnał wyjściowy neuronu

1 Wstęp

W niniejszej pracy porównano skuteczność wielowymiarowych metod rozpoznawania wzorca i klasyfikacji zastosowanych jako narzędzie analityczne w spektroskopii rezonansu magnetycznego (ang. *Magnetic Resonance Spectroscopy*, MRS). *In vivo* ^1H MRS – spektroskopia protonowa *in vivo* – otworzyła ogromne możliwości badania procesów zachodzących w organizmach żywych na poziomie molekularnym. Pomimo swoich oczywistych zalet, ciągle istnieją opory środowiska medycznego przed jej rutynowym stosowaniem w diagnostyce klinicznej, głównie ze względu na skomplikowany charakter widm *in vivo* ^1H MRS. Z tego powodu metabonomiczne podejście do spektroskopii rezonansu magnetycznego – upraszczające wgląd w informację biochemiczną zawartą w widmach – jest obecnie przedmiotem badań wielu ośrodków naukowych na całym świecie. Łączy ono zagadnienia z takich dziedzin nauki jak fizyka, informatyka, medycyna oraz chemia i stwarza możliwość detekcji zmian w metabolizmie, zarówno tych, które są efektem procesu chorobowego, jak i następstwem zastosowanego leczenia, zanim ujawnią one swoją obecność w diagnostycznych badaniach obrazowych. Dzięki temu można szybciej podjąć skuteczne decyzje kliniczne.

W tej pracy wykorzystano narzędzia metabonomiczne w analizie widm *in vivo* ^1H MRS pacjentów leczonych onkologicznie na nowotwory tylnego dołu czaszki. Ocenie i klasyfikacji poddano wpływ obecności tkanki nowotworowej oraz zastosowanego leczenia na metabolizm mózdzku, ponadto dokonano identyfikacji profili metabolicznych charakterystycznych dla wznowy i progresji nowotworu.

2 ^1H MRS jako narzędzie w diagnostyce klinicznej

2.1 Wprowadzenie

Sformułowanie pojęcia *magnetycznego rezonansu jądrowego* (ang. *Nuclear Magnetic Resonance*, NMR) jest przypisywane Rabiemu, który przeprowadzał doświadczenia nad wykorzystaniem fenomenu magnetycznego rezonansu do pomiaru wartości spinów jąder atomowych [Rabi 1937, Rabi 1938]. On jako pierwszy zaobserwował, że fale elektromagnetyczne o odpowiedniej częstotliwości odwracają spiny jąder izolowanych cząsteczek umieszczonych w polu magnetycznym.

Bazując na jego doświadczeniach w 1946 roku Purcell i Bloch [Bloch 1946, Purcell 1946] po raz pierwszy opisali uproszczoną metodę obserwacji rezonansu magnetycznego w cząsteczkach cieczy i ciał stałych. Cztery lata później Proctor i Yu odkryli zjawisko przesunięcia chemicznego (ang. *chemical shift*) [Proctor 1950], co otworzyło drogę dla praktycznych zastosowań rezonansu magnetycznego, m.in. w badaniach materiałów biologicznych. Prekursorem w tej dziedzinie był Odeblad, który w 1956 roku przeprowadził doświadczenia na komórkach krwi [Odeblad 1956]. Jednakże dopiero wprowadzenie spektroskopii impulsowej z wykorzystaniem transformaty Fouriera okazało się prawdziwym przełomem w dziedzinie magnetycznego rezonansu jądrowego [Ernst 1966].

Początkowo badania *in vivo* przeprowadzane były z wykorzystaniem cewek powierzchniowych [Ackerman 1980], a dotarcie do głębiej położonych lokalizacji wymagało implantowania cewek w pobliże badanych narządów [Weiner 1980], dopiero zastosowanie dodatkowych pól gradientowych umożliwiło wgląd w metabolizm dowolnie wybranej tkanki [Gordon 1980].

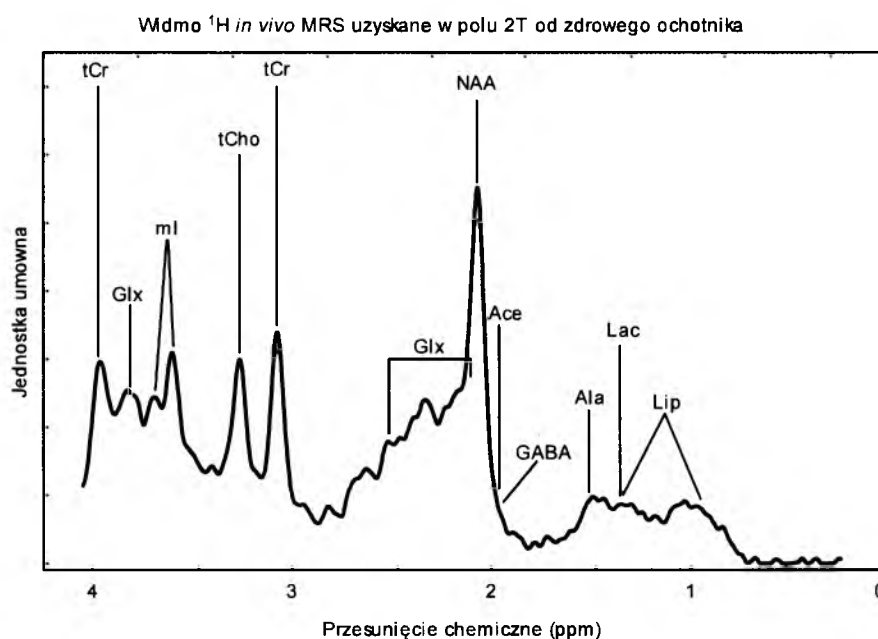
Pomimo wysokiej naturalnej zawartości (abundancji) wodoru w organizmach żywych, wąski zakres dostępnych przesunięć chemicznych w widmie ^1H oraz silny sygnał pochodzący od wody spowodowały, że pierwotnie spektroskopia NMR opierała się głównie na wykorzystaniu jąder fosforu ^{31}P i węgla ^{13}C . Pierwsze widma protonowe *in vivo* mózgu zarejestrowane zostały w 1983 roku, kiedy to Behar za pomocą cewek

powierzchniowych zaobserwował wzrost sygnału mleczanu w reakcji na hipoksję mózgową u szczura [Behar 1983]. Dwa lata później Bottomley opublikował pierwsze protonowe widmo mózgu człowieka [Bottomley 1985].

W krótkim czasie spektroskopia ^1H NMR znalazła zastosowanie jako efektywna i nieinwazyjna metoda analizy ilościowej metabolitów mózgowych [Barker 1993, Frahm 1989, Hennig 1992, Michaelis 1993], a mózg ze względu na dużą homogeniczność tkanki, łatwość dostępu oraz ograniczone artefakty ruchowe stał się najczęściej badanym spektroskopowo organem.

2.2 Neurometabolity

Przy obecnym stanie wiedzy technika *in vivo* ^1H MRS w zastosowaniach klinicznych pozwala rozróżnić kilkanaście metabolitów mózgowych. Rysunek 2.1 przedstawia prawidłowe widmo mózgu z zaznaczonymi pozycjami sygnałów pochodzących od najważniejszych metabolitów.



Rysunek 2.1. Widmo *in vivo* ^1H MRS pochodzące od zdrowego ochotnika (zakres spektralny 0,2 – 4,0 ppm) zarejestrowane w polu 2 T przy następujących parametrach akwizycji: TE/TR/Acq = 35/1500/50.

Zestawienie przesunięć chemicznych oraz multipletowości sygnałów dla neurometabolitów widocznych w spektroskopii protonowej „zdrowego” mózgu jest zamieszczone w Załączniku (tabela 9,1, str. 149).

2.2.1 N-acetylo asparaginian (NAA)

NAA jest charakterystycznym dla ośrodkowego układu nerwowego (OUN) aminokwasem występującym jedynie w neuronach i oligodendrocytach o dominującym w widmie ^1H MRS zdrowego mózgu singletcie przy 2,01 ppm i trzech słabszych dubletach dubletów przy 2,49, 2,67 i 4,38 ppm [de Graaff 2007].

Istnieje kilka hipotez na temat roli, jaką NAA odgrywa w komórkach OUN, jednak jego dokładna funkcja nie jest znana. Zakłada się, że może on spełniać rolę organicznego osmolitu zapobiegającego deficytowi anionów w neuronach lub działać jako bezpośredni prekursor biosyntezy N-acetylo-L-aspartylo-glutaminy, dipeptydu będącego ważnym neuroprzekaznikiem. Ponadto sugeruje się, że NAA podnosi zdolność mitochondriów do produkcji energii w wyniku przemiany glutaminianu oraz pełni funkcję donora grup acetylowych w syntezie lipidów wchodzących w skład osłony mielinowej neuronów [Moffett 2007]. Dwie ostatnie z wymienionych funkcji stanowią o kluczowym znaczeniu NAA w spektroskopii *in vivo* ^1H MRS, gdzie jego stężenie przyjmuje się za marker gęstości i prawidłowego funkcjonowania neuronów [de Graaf 2007].

Zmniejszenie intensywności lub nawet całkowity zanik sygnału NAA towarzyszy chorobom, w których stwierdza się zanik neuronów lub upośledzenie ich funkcji, jak również upośledzenie funkcji mitochondriów. Są to m.in. nowotwory, choroba Alzheimera, ostre udary mózgu, encefalopatie oraz stwardnienie rozsiane. Wzrost stężenia NAA został odnotowany jedynie w przypadku choroby Canavan oraz u dzieci chorych na niedokrwistość sierpowatokrwinkową [de Graaff 2007, Moffett 2007].

Zmiany w stężeniu NAA mogą być częściowo, a w przypadku łagodniejszych schorzeń całkowicie odwracalne, co zostało zaobserwowane przy niedotlenieniu, urazowym uszkodzeniu mózgu u dzieci czy w stwardnieniu rozsianym [Moffett 2007].

2.2.2 Kreatyna (Cr) i fosfokreatyna (PCr)

Cr i PCr dają dwa sygnały rezonansowe przy 3,03 i 3,93 ppm pochodzące odpowiednio od ich grup metylowych i metylenowych. Ze względu na nakładanie się sygnałów Cr i PCr, spowodowane szybką wymianą chemiczną pomiędzy oboma metabolitami, intensywności integralne singletów przy 3,03 i 3,93 ppm reprezentują całkowite stężenie kreatyny (tCr) [de Graaff 2007].

Stężenie tCr jest największe w oligodendrocytach oraz astrocytach [Imamura 2003] i przyjmuje względnie stałe, zależne od rodzaju tkanki nerwowej, wartości [Michaelis 1993]. W przypadku wielu chorób stężenie to utrzymuje się na niezmiennym poziomie,

dlatego w *in vivo* ^1H MRS jest często wykorzystywane jako wewnętrzny standard do określania zmian w stężeniach pozostałych metabolitów [Brown 1995, Hayashi 2003, Rutkowski 2003, Sibtain 2007, Simmons 1998]. Jednakże w niektórych sytuacjach może to prowadzić do niewłaściwych wyników [Li 2003, Imamura 2003].

Metaboliczna rola Cr i PCr polega na utrzymywaniu stałego poziomu ATP poprzez reakcję Lohmanna [Lohmann 1934] oraz na transporcie ATP z miejsca produkcji (mitochondriów) do miejsca wykorzystania, np. w synapsach chemicznych [de Graaff 2007]. Dlatego też poziom tCr jest uznawany za wskaźnik prawidłowego funkcjonowania procesów energetycznych w komórce.

W przypadku poważnych zmian patologicznych (nowotwory, wrodzone wady metaboliczne, wylew) obserwowane jest obniżenie lub całkowity zanik sygnału tCr [Andres 2008, de Graaff 2007]. Wzrost stężenia tCr przypisywany jest migracji oligodendrocytów lub glejozie [Mader 2008].

2.2.3 Związki cholinowe (tCho)

Trzecim pod względem intensywności sygnałem w widmie zdrowego mózgu (po NAA i tCr) jest tCho. Sygnał związków cholinowych występuje przy 3,2 ppm, a w jego skład wchodzi rezonanse pochodzące od grup metylowych fosfocholiny, glicerofosfocholiny oraz śladowych ilości wolnej choliny. Niewielki wkład mają też sygnały pochodzące od etanolaminy, mio-inozytolu oraz tauryny [de Graaff 2007].

Cholina jest prekursorem do syntezy acetylocholiny, ważnego neurotransmitera, oraz fosfolipidów wchodzących w skład błon komórkowych i osłony mielinowej neuronów [de Graaff 2007, Michel 2006].

Bezpośrednia interpretacja zmian w natężeniu sygnału tCho jest skomplikowana ze względu na dużą liczbę składowych tworzących ten sygnał rezonansowy. Jednakże wzrost stężenia tCho przypisywany jest procesom demielinizacji, towarzyszącym chorobom zapalnym ośrodkowego układu nerwowego, OUN [de Graaff 2007, Hayashi 2003, Rovira 2002], oraz procesom proliferacji w tkankach nowotworowych [Callot 2008, Hayashi 2003]. Obniżone stężenie tCho jest obserwowane przy wylewie i uszkodzeniach wątroby [de Graaff 2007].

2.2.4 Mio-inozytol (mI)

Mio-inozytol to alkohol polihydroksylowy budową przypominający glukozę, który w widmie ^1H MRS *in vivo* daje dublet dubletów przy 3,52 ppm i tryplet przy 3,61 ppm oraz dwa słabsze tryplety przy 3,27 i 4,05 ppm [de Graaff 2007]. Znajduje się głównie w komórkach glejowych, przez co uważany jest za wskaźnik ich aktywności lub liczby [Brand 1993]. Ponadto mI pełni funkcję osmoregulatora [de Graaff 2007] i, podobnie jak cholina, jest produktem procesów demielinizacyjnych [Ross 2001].

Wzrost sygnałów mI jest widoczny w stwardnieniu rozsianym, infekcjach wywołanych wirusem HIV, chorobie Alzheimer'a, niektórych typach nowotworów oraz uszkodzeniach mózgu [Castillo 2000, de Graaff 2007, Ross 2001], natomiast obniżone stężenie mI występuje w encefalopatii wątrobowej [Tarasów 2003].

2.2.5 Glutaminian (Glu) i glutamina (Gln)

Glu i Gln to dwa aminokwasy, nierozróżnialne w słabszych polach magnetycznych. Zazwyczaj są wspólnie oznaczane jako Glx i dają w widmie *in vivo* ^1H MRS nakładające się multiplety w obszarze 2,04 – 2,46 ppm oraz pomiędzy 3,75 i 3,76 ppm [de Graaff 2007, Ross 2001].

Oba te aminokwasy ulegają wzajemnym przemianom. Glutamina jest syntezowana w astrocytach w wyniku przyłączenia przez glutaminian reszty aminowej. Natomiast reakcja odwrotna zachodzi w neuronach. Jednym z zadań przemiany glutaminianu w glutaminę jest zapobieganie nagromadzeniu się szkodliwego dla tkanki nerwowej amoniaku [Daikhin 2000].

Ponadto glutaminian pełni rolę ważnego neuroprzekaźnika, odpowiedzialnego za zachowania ruchowe, zdolność poznawczą i emocje [Felipo 2006]. Jest również prekursorem głównego neuroprzekaźnika hamującego GABA [de Graaff 2007].

Wzrost stężenia Glx jest obserwowany w przypadku niedotlenienia, niedokrwienia, wątrobowych i niedokrwiennych encefalopatii [Salibi 1998] oraz wrodzonych wad cyklu mocznikowego [Choi 2001].

2.2.6 Mleczan (Lac)

Lac jest produktem glikolizy beztlenowej i ze względu na małe stężenie w zdrowym mózgu jego sygnał nie jest wyraźnie zaznaczony w widmie *in vivo* ^1H MRS. Uwidacznia się jako dublet przy 1,31 ppm w sytuacjach ograniczonego dostępu tlenu będących następstwem udaru niedokrwiennego, niedotlenienia, nowotworów, chorób

mitochondrialnych oraz stanów zapalnych OUN. Dlatego też Lac uważa się za wskaźnik uszkodzenia procesu metabolizmu utleniającego [Bianchi 2003, de Graaff 2007, Imamura 2003]. Intensywność sygnału Lac wydaje się korelować ze stopniem złośliwości nowotworu [Li 2005].

2.2.7 Lipidy (Lip)

Pomimo iż Lip stanowią od 4 do 16 % masy pojedynczej komórki, to podobnie jak Lac, nie są wykrywane metodą ^1H MRS w zdrowym mózgu. Związane jest to z ograniczeniem ich ruchliwości w błonach komórkowych. W wyniku rozpadu tych błon, uszkodzenia mieliny oraz intensywnej proliferacji komórek lipidy uwidaczniają się w widmie w postaci dwóch pasm przy 0,9 oraz 1,3 ppm pochodzących odpowiednio od ich grup metylowej i metylenowej [Hakumäki 2000, Imamura 2003].

Sygnały Lip o dużej intensywności wskazują na poważne zmiany patologiczne, wliczając: martwicę, nowotwory, stwardnienie rozsiane i inne zmiany demielinizacyjne, oraz uszkodzenia zapalne [Hakumäki 2000, Imamura 2003, Salibi 1998].

Intensywność sygnałów Lip koreluje z poziomem martwicy oraz, podobnie jak w przypadku Lac, ze stopniem złośliwości nowotworu [Chong 1999, Imamura 2003, Li 2005]. Ponadto stosunek intensywności sygnałów grupy metylenowej do metylowej (CH_2/CH_3) wykazuje pozytywną korelację ze wznową nowotworu [Matulewicz 2006].

2.2.8 Kwas γ – aminomasłowy (GABA)

GABA jest w mózgu ważnym neurotransmiterem hamującym, który w widmie ^1H MRS daje dwa tryplety przy 2,28 i 3,01 ppm oraz kwintet przy 1,89 ppm. Sygnały te nie są zazwyczaj wykrywane w słabszych polach ze względu na nakładanie się rezonansów od bardziej prominentnych związków [de Graaff 2007]. Mogą pojawić się w widmie w sytuacji znacznie podwyższonego stężenia, np. u palaczy papierosów [Zhu 2002] oraz narkoleptyków [Kim 2008], jak również jako efekt kuracji przeciwpadaczkowej [Hammen 2002], przeciwdepresyjnej [Sanacora 2002] oraz przy bezpośrednim podawaniu GABA w różnych schorzeniach neurologicznych.

2.2.9 Octan (Ace)

Octan również nie jest wykrywany w zdrowym mózgu, tym bardziej, że pojedyncza grupa metylowa tej małej molekuly daje sygnał przy 1,9 ppm, pokrywający się z kwintetem GABA (1,89 ppm) [de Graaff 2007, Imamura 2003]. Wyraźny sygnał Ace

jest m.in. markerem ropnia mózgu, gdzie uważany jest za jeden z produktów procesu fermentacji [Imamura 2003]. Wzrost stężenia octanu zaobserwowano również w remitująco-nawracającym stwardnieniu rozsianym. Prawdopodobnie wynika on z zaburzonego metabolizmu produktów hydrolizy NAA [Sharma 2000].

2.2.10 Alanina (Ala)

Ala jest nienasyconym aminokwasem, który w sytuacjach patologicznych, takich jak oponiaki, ropienie mózgu oraz rzadziej nowotwory złośliwe typu glioblastoma, ujawnia się jako dublet przy 1,47 ppm [Imamura 2003, de Graff 2007].

2.3 Zastosowanie *in vivo* ^1H MRS i problem interpretacyjny

Skomplikowany charakter widma *in vivo* ^1H MRS wynika z obecności dużej liczby nakładających się sygnałów, szumu i artefaktów aparaturowych. Analizę widm utrudniają też takie czynniki jak skorelowanie sygnałów oraz istotna w badaniach *in vivo* zmienność międzyosobnicza. Z tych powodów zastosowanie klasycznych metod statystycznych jest tu bardzo czasochłonne, a interpretacja i przypisanie otrzymanych wyników do konkretnych stanów klinicznych nastręcza wiele trudności.

Dlatego też spektroskopia NMR znajduje zastosowanie głównie w badaniach naukowych przeprowadzanych na zwierzętach lub ochotnikach, a wdrażanie jej do rutynowej diagnostyki klinicznej przebiega powoli.

Pomimo tego, najnowsze badania ujawniają istotny potencjał ^1H MRS w rozróżnianiu i diagnozowaniu różnych typów guzów mózgowia, ocenie efektów leczenia radioterapeutycznego oraz jako badania pomocniczego przy planowaniu biopsji [Callot 2008, Kwock 2006, Rutkowski 2003, Sibtain 2007]. Ponadto metoda ta pozwala na ocenę stopnia złośliwości guza [Fayed 2008, Jeun 2005], zajmuje również szczególne miejsce w pediatrii [Dezortova 2008] oraz rozpoznawaniu różnego typu schorzeń neurologicznych [Doelken 2008, Firbank 2002, Kantarci 2007, Mader 2008,].

Zupełnie nową jakością w analizie widm ^1H MRS jest zastosowanie metod analizy wielowymiarowej (ang. *multivariate analysis*, MA). Takie podejście automatyzuje proces odczytywania z widm informacji biochemicznych i dostarcza łatwych w interpretacji klinicznej wyników graficznych. Nosi ono miano *metabonomiki*.

Obecnie, dzięki wykorzystaniu zaawansowanych komputerów i algorytmów, metody MA znajdują praktyczne zastosowanie w wielu dziedzinach przemysłu,

inżynierii, nauk społecznych, informatyce, chemii, geologii i genetyce oraz odgrywają istotną rolę w rozwoju badań naukowych.

Zastosowanie MA do analizy danych spektroskopowych daje istotne rezultaty w kontroli jakości [Al-Qadiri 2008, Blanco 2007, Tarachiwin 2007], monitorowaniu procesów produkcyjnych [Garcia 1997, Jørgensen 2008, Pöllänen 2005,] jak również w badaniach znalezisk archeologicznych [Erdem 2008, Marengo 2005].

Dlatego też odpowiednie wykorzystanie potencjału metabonomiki w celu zautomatyzowania analizy widm MRS oraz zapewnienia interpretowalnych klinicznie wyników może stanowić istotny krok w kierunku rozpowszechnienia *in vivo* ^1H MRS w diagnostyce klinicznej.

3 Metabonomika

W ogólnym znaczeniu metabonomiką nazywamy ilościową analizę wielowymiarową reakcji metabolicznej żywej tkanki na zewnętrzne lub wewnętrzne bodźce patofizjologiczne [Nicholson 1999]. Jest to nowa i szybko rozwijająca się dziedzina zajmująca się badaniem procesów biologicznych.

W zastosowaniu do spektroskopii NMR narzędzia metabonomiczne – pod postacią metod rozpoznawania wzorca (ang. *pattern recognition*, PR) – pozwalają na sprowadzenie wielowymiarowego zagadnienia jednoczesnej analizy wielu widm do kilku nowych, łatwo interpretowalnych zmiennych.

Rozpoznawanie wzorca to zdolność do identyfikowania i interpretacji regularności w złożonych i zawierających szumy zestawach danych, której główne cele to:

- Wydobywanie informacji z wielowymiarowych danych.
- Wykluczanie skorelowanych zmiennych.
- Odkrywanie wzorców (różnic i podobieństw) tkwiących wewnątrz danych oraz odnajdywanie cech będących ich przyczyną.
- Budowanie modeli zdolnych do przewidywania klasy nowych, nieznanych przypadków.

3.1 Metabonomika oparta na spektroskopii *in vitro*

Spektroskopia NMR płynów ustrojowych dostarcza wielu informacji na temat wewnętrznych procesów metabolicznych organizmów żywych. Jednakże dostępność spektrometrów o coraz wyższej rozdzielczości, gdzie zakres wykorzystywanych pól magnetycznych mieści się w przedziale 11,7 – 21,1 T, zwiększa ilość informacji pozyskiwanych z rejestrowanych widm.

Bezpośredni wpływ na zmiany stężeń metabolitów w organizmie człowieka mają zarówno procesy patologiczne [Bianchi 2003, Gujar 2005, Petroff 1995, Rigotti 2007, Soher 2005], jak i przyjmowane leki [Ernst 2002, Weber 1999]. Nie bez znaczenia są również inne zewnętrzne czynniki, takie jak skutki uboczne leczenia, używki lub

suplementy diety [Durazzo 2004, del Mar Matarín 2007, Lin 2001, Stoll 1995, Waldrop 1998].

Zastosowanie metod PR do analizy widm ^1H NMR próbek moczu pozwoliło na określenie wzorców metabolicznych charakterystycznych m.in. dla osób z chorobą zwyrodnieniową stawów [Lamers 2005], noworodków z wrodzonymi wadami metabolizmu [Constantinou 2005] oraz chorych na stwardnienie rozsiane [‘t Hart 2003]. W badaniach surowicy krwi, dzięki połączeniu technik ^1H NMR i PR wskazano na możliwość szybkiej diagnozy sepsy oraz nowotworu nerkowokomórkowego [Gao 2008, Xu 2008]. Z kolei metabonomiczna analiza próbek moczu oraz surowicy krwi pozwoliła wykryć zmiany w metabolizmie wywołane lekami lub substancjami toksycznymi [Antti 2004, Beckonert 2003, Heijne 2005].

W badaniach *in vitro* nad metabolizmem tkanek nowotworowych podstawowym zastosowaniem metod PR w analizie widm NMR jest rozróżnianie profili metabolicznych charakterystycznych dla danego nowotworu oraz rozróżnianie profilu nowotworowego i typowego dla tkanki zdrowej [Maxwell 1998, Roda 2000].

3.2 Metabonomika oparta na spektroskopii *in vivo*

Obecnie metody analizy wielowymiarowej zyskują coraz większą popularność w spektroskopii *in vivo*, gdzie ich wysoka skuteczność w wykrywaniu i interpretacji subtelnych różnic w profilach metabolicznych może stanowić ważne źródło pomocnicze dla podejmowania istotnych klinicznie decyzji.

Jedną z pierwszych prób wdrożenia metod PR do diagnostyki klinicznej jest międzynarodowy program INTERPRET (ang. *International network for pattern recognition of tumours using magnetic resonance*), którego najważniejszym osiągnięciem było stworzenie kilku prototypowych systemów wspomagających decyzje klinicystów

(ang. *decision support system*, DSS) w diagnozowaniu guzów mózgu na podstawie widm ^1H MRS [Tate 2006, Pérez-Ruiz 2010].

Głównym zadaniem systemu diagnozowania INTERPRET było rozróżnianie trzech grup nowotworowych: oponiaków, glejaków o niskim stopniu złośliwości oraz nowotworów złośliwych. Podczas walidacji klinicznej otrzymano bardzo dobre rezultaty również dla nietypowych zmian nowotworowych, takich jak prymitywny guz neuroektodermalny, uzyskując ogólną skuteczność decyzyjną równą 89% [Tate 2006]. Choć dane spektroskopowe do budowy INTERPRET DSS zostały zebrane z kilku placówek, gdzie pozyskiwane były na różnych aparatach przy zbliżonych do siebie parametrach sekwencji pomiarowych, to jednak metody PR okazały się odporne na zmiany wynikające z niejednorodności bazy danych [Tate 2003, Tate 2006].

Algorytm INTERPRET DSS został skonstruowany na bazie liniowej analizy dyskryminacyjnej (ang. *linear discriminant analysis*, LDA), której poważnym ograniczeniem jest nieefektywność w analizie zagadnień wielowymiarowych. Innymi słowy, aby osiągnąć wiarygodne rezultaty, musi być więcej przypadków wejściowych niż zmiennych opisujących każdy nich. Spełnienie tego kryterium jest bardzo trudne w sytuacji, kiedy analizowane są dane spektroskopowe, gdzie liczba zmiennych może mieścić się w przedziale (w zależności od rozdzielczości) od 256 do 2048 punktów spektralnych. Dlatego też widma zostały uprzednio poddane dwustopniowej analizie wstępnej. Najpierw każde widmo zostało porównane wizualnie z widmem średnim swojej klasy, a następnie poprzez analizę korelacji każdej z możliwych par klas wyodrębniono obszary spektralne o największej zdolności różnicującej, które zostały wykorzystane w końcowym etapie, tj. w analizie LDA, jako zredukowane zmienne wejściowe.

Rozwinięcie niektórych możliwości projektu INTERPRET powstało pod nazwą SpectraClassifier 1.0 [Ortega-Martorell 2010]. SpectraClassifier 1.0 to napisany w języku JAVA klasyfikator skonstruowany na danych z projektu INTERPRET i realizujący

problem klasyfikacji w oparciu o liniowy dyskryminator Fishera (ang. Fisher Linear Discriminant Analysis, Fisher LDA). W wyniku autorzy otrzymali poprawną klasyfikację rzędu 90% dla trzech podstawowych grup nowotworów różnicowanych w projekcie INTERPRET (oponiaków, glejaków o niskim stopniu złośliwości oraz nowotworów złośliwych).

Idea redukcji wymiaru danych przed przystąpieniem do właściwej analizy jest często spotykana [Devos 2004, Lukas 2004, Maxwell 1998, Opstad 2007]. Jednakże zbyt wielka ingerencja w dane wejściowe nie jest zalecana ze względu na możliwość usunięcia subtelnych i istotnych informacji oraz zwiększenie szumu zawartego w danych. Co więcej, każdy kolejny etap obróbki danych oddala nas od celu zasadniczego, jakim jest szybka i automatyczna analiza.

Dlatego też pojawiają się próby wykorzystania tzw. metabonomiki chemometrycznej, gdzie danymi wejściowymi do analizy są całe widma. Obiecujące rezultaty otrzymano w rozróżnianiu widm uzyskanych z guzów przerzutowych do mózgu w odniesieniu do okresu przeżywalności pacjenta, w klasyfikacji guzów mózgu oraz w detekcji guzów wtórnych mózgowia po radioterapii [Menze 2006, Opstad 2007, Sjøbakk 2007].

Pomimo, iż niektórzy autorzy sugerują niższą skuteczność podejścia chemometrycznego do zagadnień klasyfikacji [Menze 2006, Opstad 2007], to ich prace opierają się na porównaniu narzędzi metabonomicznych stosowanych w analizie danych o zredukowanej liczbie zmiennych wejściowych, podczas gdy do analizy wielu zmiennych, gdzie problem klasyfikacji nie zawsze jest zagadnieniem liniowym, lepiej sprawdzają się modele PR zbudowane na bardziej skomplikowanych, nieliniowych algorytmach.

4 Podstawy teoretyczne spektroskopii

NMR

4.1 Podstawy fizyczne NMR

Fundamentalną własnością jąder atomowych, determinującą ich strukturę jest spin \mathbf{I} (kwantowy moment pędu). Jeżeli spin jądra jest różny od zera, to jądro posiada moment magnetyczny:

$$\boldsymbol{\mu}_I = \gamma \mathbf{I} \quad (4.1)$$

gdzie γ jest stosunkiem giromagnetycznym [Haken 1998]. Długość wektora spinu może przyjmować tylko wartości dane wzorem:

$$|\mathbf{I}| = \frac{h}{2\pi} \sqrt{I(I+1)} \quad (4.2)$$

Liczba kwantowa I spinu jądra może być wartością całkowitą lub połówkową, a dla jąder trwałych przybiera wartości od 0 do 8. W warunkach doświadczalnych możliwa jest obserwacja jedynie składowej wektora spinu (jak i tylko składowej momentu magnetycznego) w kierunku osi kwantowania, który może być zdefiniowany na przykład zgodnie z kierunkiem zewnętrznego pola magnetycznego \mathbf{B}_0 . Składowa z-owa spinu posiada wartości własne:

$$I_z = m_I \frac{h}{2\pi} \quad (4.3)$$

czyli:

$$\mu_z = \gamma m_I \frac{h}{2\pi} \quad (4.4)$$

gdzie magnetyczna liczba kwantowa m_I może przyjmować jedynie wartości $m_I = -I, -I + 1, \dots, I - 1, I$. Czyli dla każdego I_z i μ_z jest możliwych $2m_I + 1$ wartości [Haken 1998].

Energia oddziaływania momentu magnetycznego z zewnętrznym polem magnetycznym \mathbf{B}_0 wynosi:

$$E = -\boldsymbol{\mu}_I \cdot \mathbf{B}_0 = -\frac{\gamma m_I h B_0}{2\pi} \quad (4.5)$$

a różnica energii pomiędzy dwoma sąsiednimi stanami kwantowymi w polu \mathbf{B}_0 , tzn. dla $\Delta m_I = \pm 1$ jest równa [de Graaf 2007]:

$$\Delta E = \frac{\gamma \hbar B_0}{2\pi} \quad (4.6)$$

Obsadzenie stanów odpowiadających skwantowanej wartości energii wyrażone jest statystyką Boltzmann [Huang 2006], a względna różnica pomiędzy obsadzeniami dwóch stanów energetycznych protonów w temperaturze pokojowej i polu magnetycznym 2 T (odpowiadającym częstości rezonansowej protonów, $\nu = 81,3$ MHz) jest rzędu $1:10^6$ na korzyść stanów o niższej energii [Salibi 1998].

Jeżeli na jądro zacznie oddziaływać dodatkowo pole elektromagnetyczne (impuls o częstotliwość radiowej, RF) skierowane prostopadle do \mathbf{B}_0 i o częstotliwości:

$$\nu = \frac{\Delta E}{h} = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \quad (4.7)$$

to możliwa jest absorpcja promieniowania i przejście pomiędzy różnymi dopuszczalnymi orientacjami spinu – jest to jądrowy rezonans magnetyczny, a częstotliwość zewnętrznego promieniowania elektromagnetycznego odpowiada częstości kołowej precesji Larmora spinów jąder w polu \mathbf{B}_0 .

Ponieważ istnieje różnica w obsadzeniach stanów energetycznych, możliwe jest zarejestrowanie sygnału absorpcji od niewielkiej ilości jąder będącej nadwyżką obsadzenia w niższym stanie energetycznym [Haken 1998].

4.1.1 Przesunięcie chemiczne

W cząsteczkach, poza jądrami będącymi obiektem zainteresowania, znajdują się również elektrony, w których po przyłożeniu zewnętrznego pola \mathbf{B}_0 indukowany jest moment magnetyczny proporcjonalny do natężenia i o przeciwnym zwrocie do kierunku przyłożonego pola. Zjawisko to nosi nazwę ekranowania diamagnetycznego (ang. *chemical shielding*) [Salibi 1998]. W wyniku ekranowania pole lokalne, czyli pole efektywne działające na dane jądro jest równe:

$$B_{\text{ef}} = B_0 - B_{\text{ind}} = B_0 - \sigma B_0 = B_0 (1 - \sigma) \quad (4.8)$$

czyli:

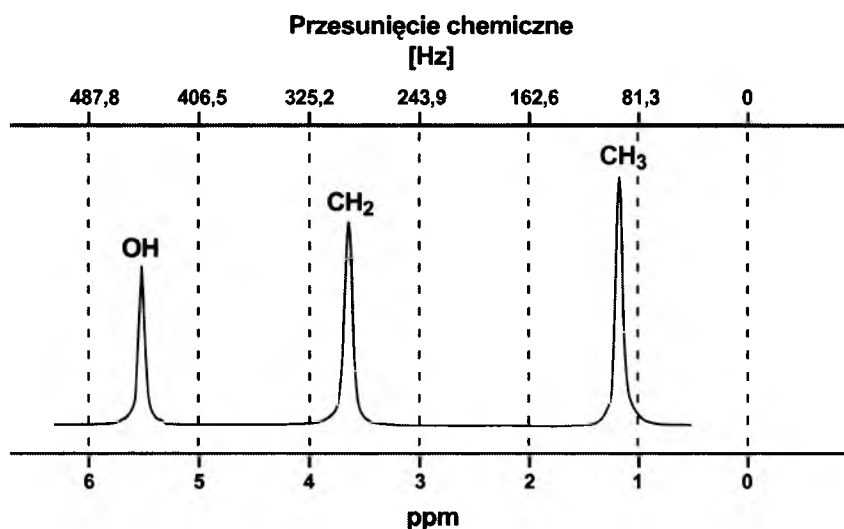
$$\nu = \frac{\gamma B_0 (1 - \sigma)}{2\pi} \quad (4.9)$$

Oznacza to, że jądra o różnych otoczeniach chemicznych mają różne częstotliwości rezonansowe w danym polu B_0 [Haken 1998] (im silniejsze ekranowanie diamagnetyczne, tym niższa częstotliwość rezonansowa jądra danej cząsteczki w polu B_0).

Przesunięcie chemiczne jest zdefiniowane jako stosunek różnicy częstotliwości rezonansowej badanego jądra i substancji wzorcowej, do częstotliwości rezonansowej substancji wzorcowej ν_{ref} [de Graaf 2007]:

$$\delta = \frac{\nu - \nu_{\text{ref}}}{\nu_{\text{ref}}} \cdot 10^6 \text{ [ppm]} \quad (4.10)$$

Jednostką przesunięcia chemicznego jest bezwymiarowa liczba ppm (ang. *parts per million*). Rysunek 4.1 przedstawia widmo ^1H MRS etanolu z wyraźnymi trzema sygnałami pochodzącymi od protonów znajdujących się w różnych otoczeniach chemicznych.



Rysunek 4.1. Widmo ^1H MRS etanolu ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) zarejestrowane w polu 2 T odpowiadającym częstotliwości rezonansowej protonów 81,3 MHz. Przesunięcie chemiczne równe 0 odpowiada sygnałowi substancji wzorcowej, natomiast rozdzielczość bezwymiarowej skali ppm odpowiada częstotliwości rezonansowej protonów w danym polu B_0 podzielonej przez 10^6 . Słabsza elektroujemność atomu węgla w porównaniu z atomem tlenu prowadzi do większego ekranowania diamagnetycznego protonów grup CH, w wyniku czego mniejsza jest częstotliwość rezonansowa tych protonów w porównaniu z protonami grupy OH.

4.2 Spektroskopia pojedynczego woksela

Spektroskopia pojedynczego woksela (ang. *single voxel spectroscopy*, SVS) to podstawowa technika spektroskopowa, która pozwala na szybkie pozyskanie widma rezonansowego z pojedynczej, niewielkiej jednostki objętości, tzw. woksela, który definiowany jest jako *obszar zainteresowania*, VOI (ang. *volume of interest*, VOI). Rejestracja widma odbywa się w trzech podstawowych krokach:

- wytłumienie sygnału wody (ang. *water suppression*),
- określenie wymiarów i lokalizacja VOI,
- akwizycja widma.

4.2.1 Wytłumienie sygnału wody

Ze względu na dużą koncentrację molekuł wody w tkankach organizmów żywych ($\approx 10^4$ razy większą niż istotnych dla badania MRS metabolitów), stosuje się specjalne sekwencje impulsów RF mających na celu wyeliminowanie sygnału rezonansowego wody z widma NMR. Najczęściej wykorzystywaną sekwencją w *in vivo* MRS jest tzw. sekwencja CHESS (ang. *chemical shift selective saturation*), gdzie efekt wytłumienia zostaje osiągnięty za pomocą trzech selektywnych impulsów RF, po których następują odpowiednio impulsy gradientowe rozfazowujące, w każdym z kierunków przestrzennych [Haase 1985].

Każdy impuls połączony z polem gradientowym wytłumia 100-krotnie sygnał wody, a wielokrotne powtórzenie całej sekwencji pozwala wytłumić go niemal całkowicie.

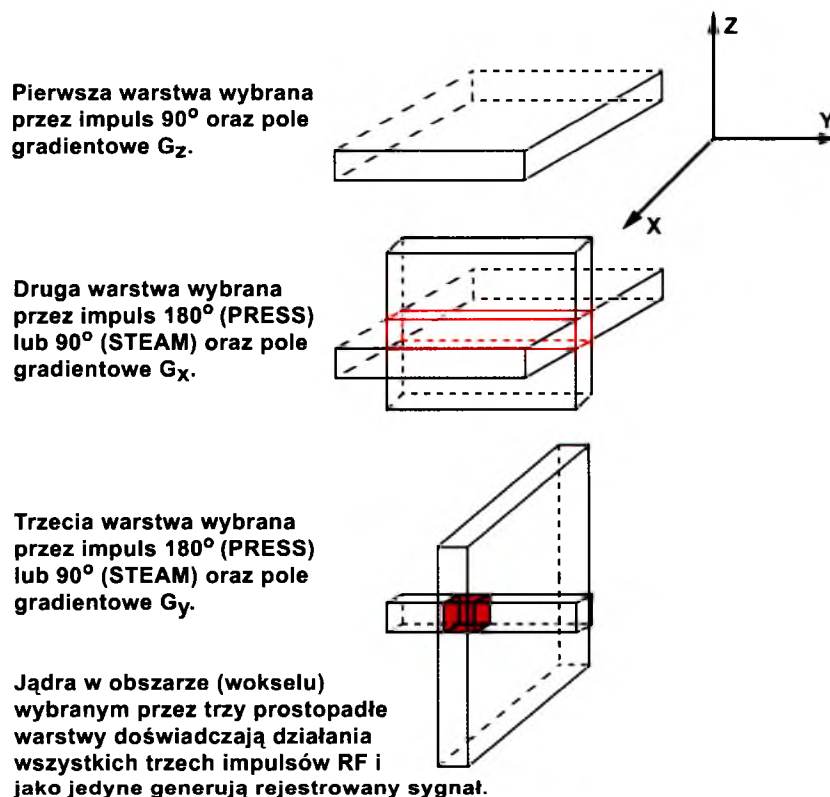
4.2.2 Określenie wymiarów i lokalizacja VOI

Przestrzenne umiejscowienie VOI w badanej tkance oraz nadanie odpowiednich rozmiarów odbywa się poprzez odpowiednią kombinację impulsów RF i pól gradientowych G_x , G_y oraz G_z [Klose 2008]. Schemat działania pól gradientowych jest widoczny na rysunku 4.2.

Wymiary objętości pomiarowej (tak zwanego woksela) wzdłuż danego kierunku w przestrzeni dane są wzorami:

$$\Delta X = \frac{\Delta \nu_x}{\gamma G_x}, \quad \Delta Y = \frac{\Delta \nu_y}{\gamma G_y}, \quad \Delta Z = \frac{\Delta \nu_z}{\gamma G_z} \quad (4.11)$$

gdzie: $\Delta \nu$ jest szerokością pasma impulsu RF [MHz].

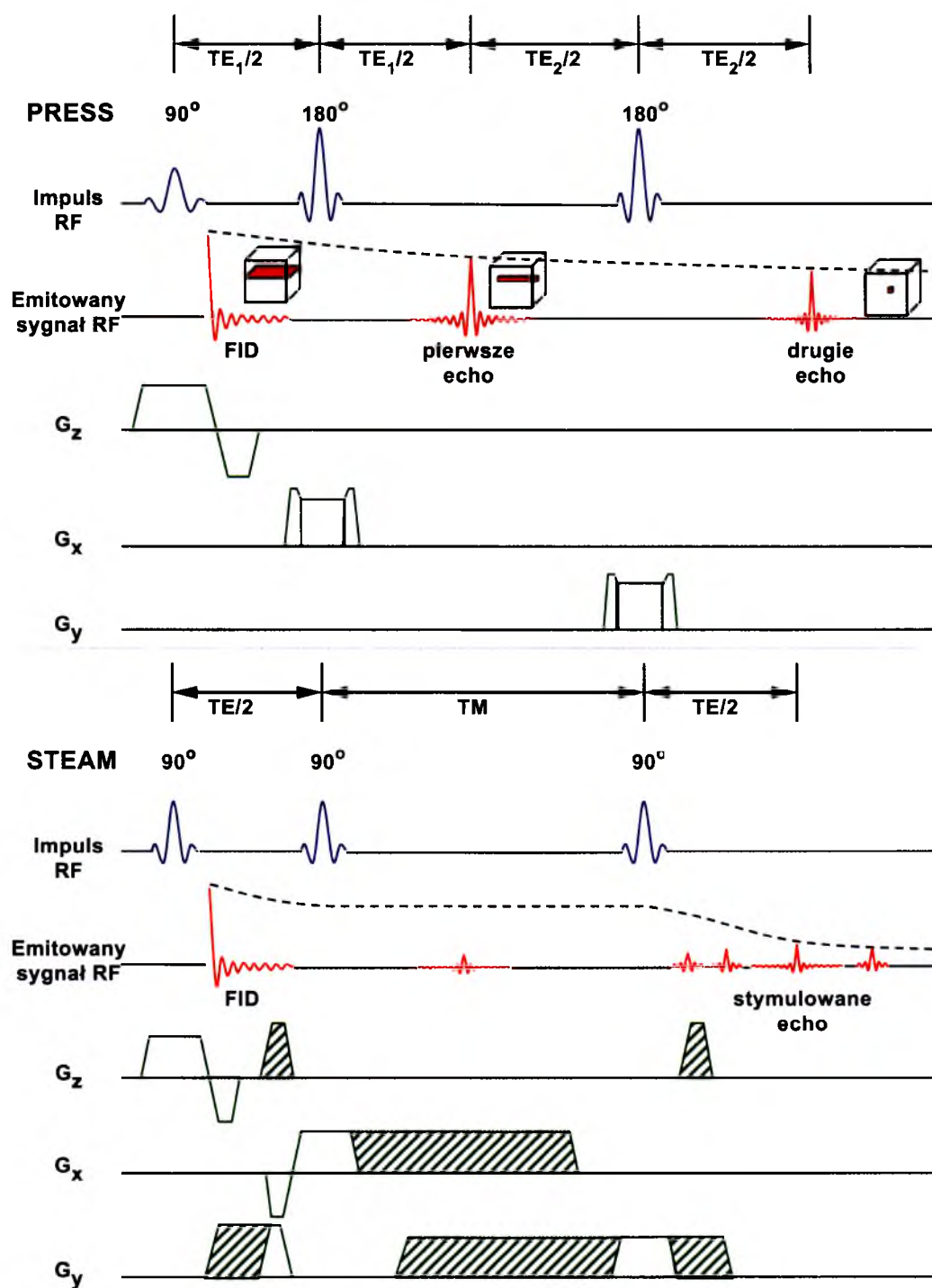


Rysunek 4.2. Procedura określenia rozmiaru i lokalizacji objętości pomiarowej (tak zwanego woksela) z wykorzystaniem trzech impulsów o częstotliwości radiowej oraz pól gradientowych.

4.2.3 Akwizycja widma

W spektroskopii pojedynczego woksela widma są pozyskiwane z wykorzystaniem dwóch technik – PRESS (ang. *point resolved spectroscopy*) [Bottomley 1987] i STEAM (ang. *stimulated echo acquisition mode*) [Frahm 1987], różniących się m.in. sekwencjami podawanych impulsów RF oraz ustawieniem pól gradientowych. Na rysunku 4.3 przedstawione jest porównanie technik PRESS i STEAM.

Technika PRESS charakteryzuje się około dwukrotnie większym stosunkiem sygnału do szumu (ang. *signal to noise ratio*, SNR) niż STEAM oraz jest mniej czuła na artefakty ruchowe i dyfuzyjne [Moonen 1989]. Natomiast STEAM pozwala wykonywać pomiary przy krótszych czasach TE (odstęp czasu pomiędzy impulsem RF a rejestracją sygnału), co daje możliwość obserwacji sygnałów pochodzących od metabolitów o krótkich czasach relaksacji spinów [Klose 2008, Moonen 1989]. Ponadto technika STEAM charakteryzuje się większą precyzją przy zbieraniu sygnału z wyselekcjonowanego woksela [Ryner 1998, Moonen 1989]. Jednakże, głównie ze względu na większy stosunek SNR oraz mniejszą czułość na artefakty ruchowe, to właśnie technika PRESS jest standardem w badaniach klinicznych.



Rysunek 4.3. Porównanie technik PRESS (góra) i STEAM (dół). W technice PRESS generowane są dwa sygnały echa o częstotliwości radiowej (RF), pierwszy jest tłumiony przez specjalne gradientowe impulsy tłumiące i pomijany. Rejestracji podlega sygnał drugiego echa (z woksela wybranego przez impulsy 90° , 180° i 180° oraz sekwencje impulsów gradientowych G_z , G_x i G_y) formowany w czasie $TE_1 + TE_2$ określanym jako całkowity czas TE sekwencji PRESS. W technice STEAM generowanych jest pięć sygnałów echa, w tym cztery po ostatnim (trzecim) impulsie 90° . Rejestracji podlega sygnał stymulowanego echa formowany w czasie $TE + TM$.

5 Charakterystyka wybranych narzędzi metabonomicznych

5.1 Analiza składowych głównych

Analiza składowych głównych (ang. *principal component analysis*, PCA) to podstawowa metoda analizy multiwariacyjnej, po raz pierwszy opisana w 1901 roku przez Pearsona [Pearson 1901].

Głównym zadaniem PCA jest redukcja wymiarów zestawów danych zawierających dużą liczbę skorelowanych ze sobą zmiennych przy jednoczesnym, możliwie jak najwierniejszym, zachowaniu wewnętrznej zmienności tych danych. Dokonuje się tego poprzez transformację danych do nowego zestawu nieskorelowanych ze sobą zmiennych, tzw. składowych głównych (ang. *principal components*, PC).

Wartość wariancji oryginalnych danych wyjaśniona przez daną składową główną jest proporcjonalna do odpowiadającej jej wartości własnej, dlatego składowe PC są uporządkowane w kierunku malejących wartości własnych, przy czym pierwsza składowa PC zawiera w sobie najwięcej informacji, natomiast ostatnia najmniej [Lavine 2000].

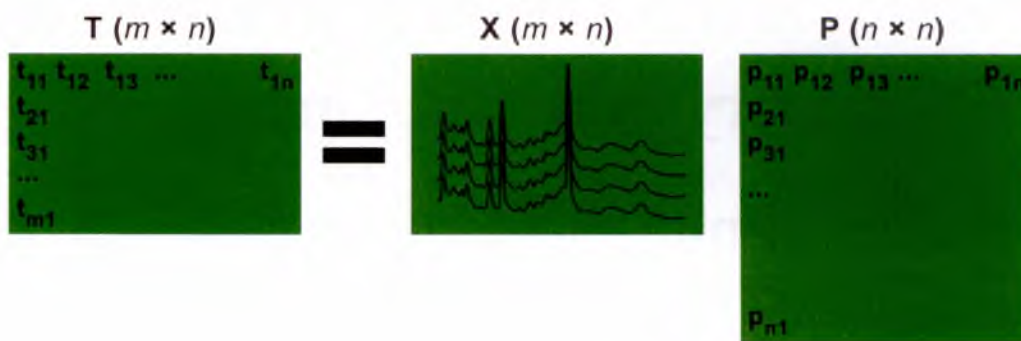
Rozmieszczenie danych wejściowych w nowym układzie współrzędnych, zbudowanym na kilku pierwszych składowych głównych obrazuje największą systematyczną wariancję oryginalnych danych, a odbywa się to poprzez liniową kombinację oryginalnych zmiennych i składowych głównych.

5.1.1 Model matematyczny PCA

Niech dane wejściowe stanowią macierz \mathbf{X} o wymiarach $m \times n$, gdzie każdy z m wierszy stanowi pojedynczą próbkę (widmo) opisaną przez n zmiennych (przesunięć chemicznych) umieszczonych w kolumnach. Weźmy teraz macierz \mathbf{P} będącą liniową transformacją \mathbf{X} :

$$\mathbf{T} = \mathbf{XP} \quad (5.1)$$

do macierzy \mathbf{T} ($m \times n$) reprezentującej \mathbf{X} w nowym układzie współrzędnych, co zostało przedstawione na rysunku 5.1.



Rysunek 5.1. Graficzne przedstawienie macierzowej transformacji PCA.

Kolumny macierzy \mathbf{P} , $\{\mathbf{p}_1, \dots, \mathbf{p}_n\}$, są zestawem nowych wektorów bazowych (składowych głównych) dla wierszy macierzy \mathbf{X} (widm), natomiast ij -ty element macierzy \mathbf{T} (t_{ij}) jest rzutem i -tego widma na j -tą składową główną [Jolliffe 2002].

Pierwszym krokiem w analizie PCA jest obliczenie macierzy kowariancji dla danych \mathbf{X} [Shlens 2005]:

$$\mathbf{C}_x \equiv \text{cov}(\mathbf{X}) \equiv \frac{1}{n-1} \mathbf{X}^T \mathbf{X} \quad (5.2)$$

Aby powyższe sformułowanie było prawdziwe, dane muszą zostać uprzednio poddane centrowaniu, tzn. należy odjąć średnią arytmetyczną danej zmiennej od wartości tej zmiennej dla każdego pomiaru (widma), co prowadzi do zestawu danych o średniej arytmetycznej każdej zmiennej równej zero. Macierz \mathbf{C}_x ma wymiar $n \times n$, jej elementy diagonalne (c_{kk}) są wariancją poszczególnych zmiennych, natomiast pozostałe elementy są kowariancją pomiędzy danymi zmiennymi, przy czym $c_{kl} = c_{lk}$. Duże wartości elementów diagonalnych świadczą o ważności „główności” danej zmiennej, a w przypadku elementów nediagonalnych, o tym że dane dwie zmienne są ze sobą skorelowane i mogą zostać zastąpione jedną zmienną.

Zadaniem metody PCA jest zminimalizować kowariancję i maksymalnie zwiększyć wariancję, co prowadzi do wniosku, że macierz kowariancji dla nowych danych \mathbf{T} (\mathbf{C}_T) powinna być macierzą diagonalną.

Macierz kowariancji dla \mathbf{T} możemy zapisać w następującej postaci [Shlens 2005]:

$$\mathbf{C}_T = \frac{1}{n-1} \mathbf{T}^T \mathbf{T} = \frac{1}{n-1} (\mathbf{X}\mathbf{P})^T (\mathbf{X}\mathbf{P}) = \frac{1}{n-1} \mathbf{P}^T \mathbf{X}^T \mathbf{X} \mathbf{P} = \frac{1}{n-1} \mathbf{P}^T \mathbf{A} \mathbf{P} \quad (5.3)$$

gdzie $\mathbf{A} = \mathbf{X}\mathbf{X}^T$ jest (z dokładnością do stałej) macierzą kowariancji danych \mathbf{X} , czyli jest macierzą symetryczną. Każda rzeczywista macierz symetryczna \mathbf{A} może być przedstawiona przy użyciu macierzy ortogonalnej \mathbf{Q} , której kolumny są wektorami własnymi macierzy \mathbf{A} i macierzy diagonalnej $\mathbf{\Lambda}$:

$$\mathbf{A} = \mathbf{Q}\mathbf{\Lambda}\mathbf{Q}^T \quad (5.4)$$

Przyjmijmy teraz, że kolumny macierzy \mathbf{P} są wektorami własnymi macierzy kowariancji \mathbf{C}_x , czyli $\mathbf{P} = \mathbf{Q}$. Podstawiając \mathbf{P} do powyższego równania otrzymujemy:

$$\mathbf{A} = \mathbf{P}\mathbf{A}\mathbf{P}^T \quad (5.5)$$

Korzystając z własności macierzy ortogonalnej ($\mathbf{P}^T = \mathbf{P}^{-1}$) i podstawiając (5.5) do (5.3) otrzymujemy:

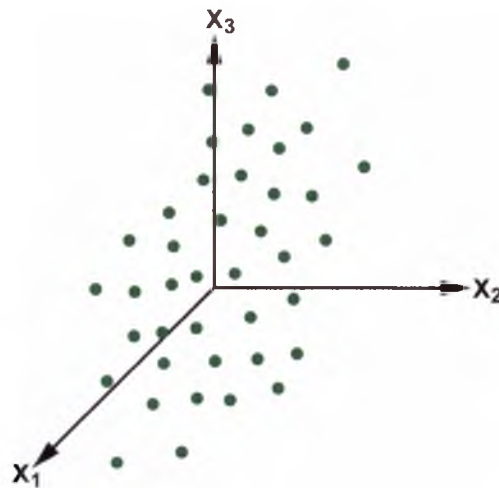
$$\mathbf{C}_T = \frac{1}{n-1} \mathbf{P}^T (\mathbf{P}\mathbf{A}\mathbf{P}^T) \mathbf{P} = \frac{1}{n-1} (\mathbf{P}^T \mathbf{P}) \mathbf{A} (\mathbf{P}^T \mathbf{P}) = \frac{1}{n-1} (\mathbf{P}^{-1} \mathbf{P}) \mathbf{A} (\mathbf{P}^{-1} \mathbf{P}) = \frac{1}{n-1} \mathbf{A} \quad (5.6)$$

Cel PCA został osiągnięty, wybór wektorów własnych macierzy kowariancji \mathbf{C}_x na kolumny macierzy transformującej \mathbf{P} diagonalizuje macierz \mathbf{C}_x .

W praktyce analiza PCA sprowadza się do wyliczenia wektorów własnych \mathbf{C}_x i umieszczenia ich w kolumnach \mathbf{P} , w kolejności malejącej, poczynając od wektora odpowiadającego największej wartości własnej, a następnie do przekształcenia macierzy \mathbf{X} [Jolliffe 2002].

5.1.2 Interpretacja geometryczna PCA

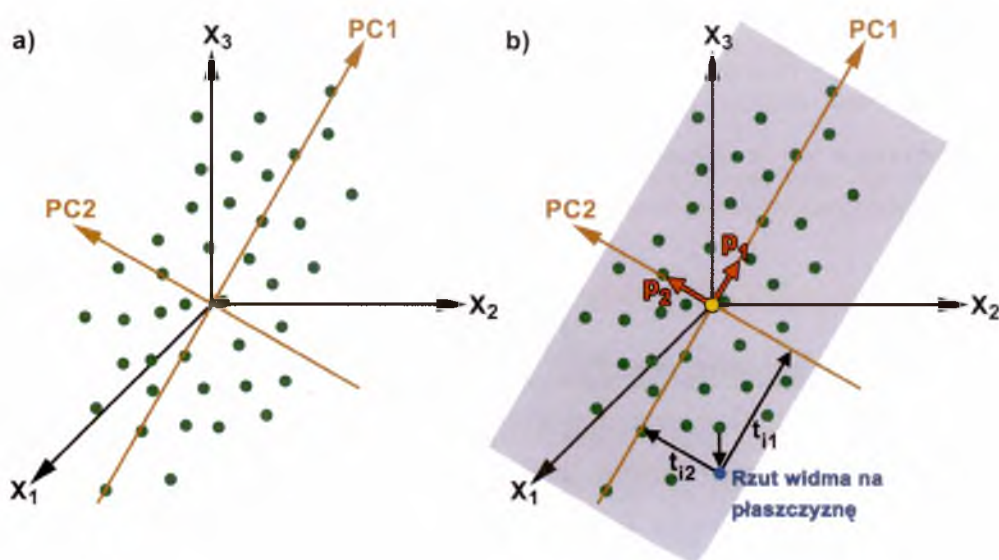
Każda zmienna (kolumna macierzy \mathbf{X}) może być traktowana jako jeden z n kierunków w przestrzeni zmiennych utworzonej przez wszystkie zmienne. Natomiast każde widmo (wiersz) stanowi jeden z m punktów umieszczonych w tej przestrzeni tworząc chmurę punktów. Procedura centrowania zmiennych powoduje, że środek tej chmury leży dokładnie w środku układu współrzędnych. Rysunek 5.2 ilustruje rozkład chmury danych w trzech wymiarach.



Rysunek 5.2. Wiersze macierzy \mathbf{X} (widma) przedstawione jako zbiór punktów w n wymiarowej przestrzeni.

PCA znajduje kierunki w przestrzeni (składowe główne) opisujące wariancję chmury danych. I tak pierwsza składowa główna to kierunek w n wymiarowej przestrzeni przechodzący przez środek układu współrzędnych, który zgodnie z metodą najmniejszych kwadratów możliwie najdokładniej przybliża rozkład danych – czyli pokrywa się z kierunkiem największej wariancji danych. Każda kolejna składowa główna jest ortogonalna do poprzedniej i wyznacza kierunki o coraz mniejszej wariancji.

Dwie składowe główne definiują płaszczyznę, na którą możemy rzutować wszystkie widma otrzymując rozkład dwuwymiarowy, jak ma to miejsce na rysunku 5.3.

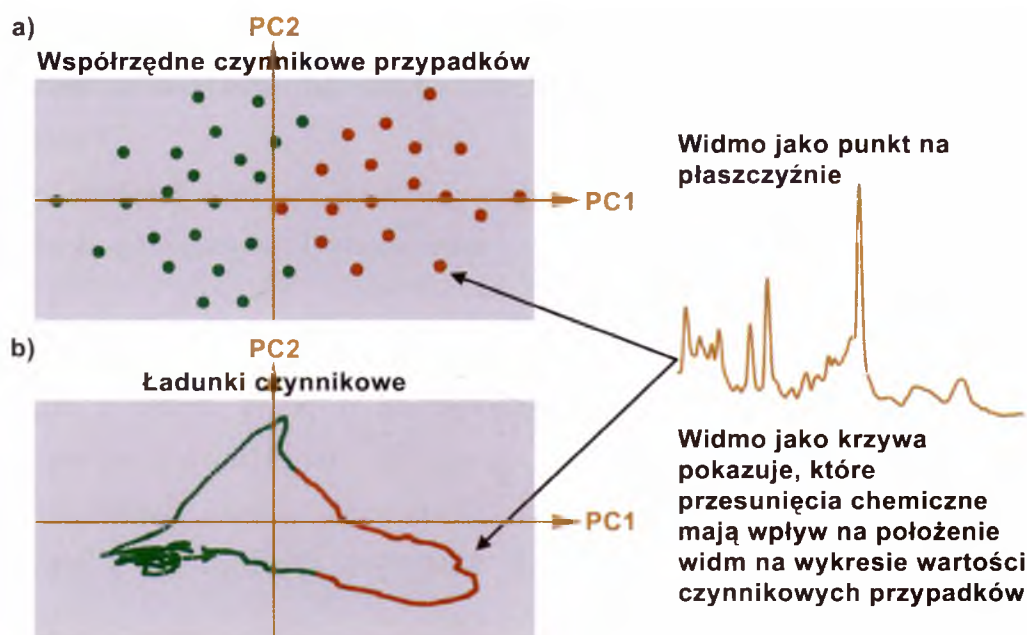


Rysunek 5.3. Rysunek a: Pierwsza składowa główna (PC1) jest linią, która w najlepszy sposób przybliża rozkład danych, co odpowiada kierunkowi największej wariancji danych. Druga składowa główna (PC2) odzwierciedla kierunek kolejnej co do wielkości wewnętrznej wariancji danych, zachowując prostopadłość względem PC1. Rysunek b: Dwie składowe główne tworzą płaszczyznę będącą oknem w n wymiarowej przestrzeni. Każde widmo może być rzutowane na tę płaszczyznę, pozwalając na prezentację rozkładu widm w dwóch wymiarach.

Współrzędne rzutowanych widm znajdują się w kolumnach macierzy \mathbf{T} i noszą nazwę współrzędnych czynnikowych przypadków (ang. *X-scores*). Kierunek składowej głównej w przestrzeni zmiennych jest wyrażony poprzez kosinusy kątów α_n pomiędzy daną składową a osiami układu oryginalnych zmiennych. Wartości tych kosinusów noszą nazwę ładunków czynnikowych zmiennych (ang. *loadings*) i określają wkład (istotność) oryginalnej zmiennej w rozkład widm na wykresie współrzędnych przypadków. Ładunki są składowymi wektorów własnych macierzy \mathbf{C}_x (kolumn macierzy \mathbf{P}).

Graficzna interpretacja PCA sprowadza się do porównania wykresów współrzędnych czynnikowych przypadków (ang. *X-score plot*) i ładunków czynnikowych

(ang. *loading plot*), co zostało przedstawione na rysunku 5.4. Widma leżące obok siebie na wykresie współrzędnych czynnikowych przypadków charakteryzują się podobnymi profilami metabolicznymi, ich położenie wzdłuż danej składowej głównej jest zdeterminowane poprzez zmienne leżące wzdłuż tej samej składowej głównej na wykresie ładunków czynnikowych.



Rysunek 5.4. Porównanie wykresów współrzędnych czynnikowych przypadków (a) i ładunków czynnikowych (b). Jeżeli widma pochodzą od dwóch różnych grup pacjentów i charakter różnic pomiędzy tymi widmami pokrywa się z kierunkiem wariancji wskazanym przez składowe główne, to dzięki metodzie PCA możliwe jest określenie, które widma należą do danej grupy oraz które przesunięcia chemiczne mają wpływ na zaobserwowane różnice.

5.1.3 Jakość modelu PCA oraz liczba wyodrębnionych składowych głównych

Jakość modelu PCA – R^2X – jest określona jako suma kwadratów danych X wyjaśniona przez wyodrębnione składowe główne:

$$R^2X = 1 - \frac{\sum (x_{\text{zaobserwowane}} - x_{\text{obliczone}})^2}{\sum (x_{\text{zaobserwowane}} - x_{\text{średnie}})^2} \quad (5.7)$$

Liczba możliwych do wyodrębnienia składowych głównych jest zadana przez rząd macierzy C_x , czyli może wynosić n . W praktyce oznaczałoby to, że wszystkie zmienne w macierzy X są niezależne, co w rzeczywistych zestawach danych zazwyczaj nie ma miejsca i liczba składowych głównych jest mniejsza od liczby zmiennych. Ponadto, do wizualizacji danych w nowym układzie współrzędnych wykorzystuje się przeważnie

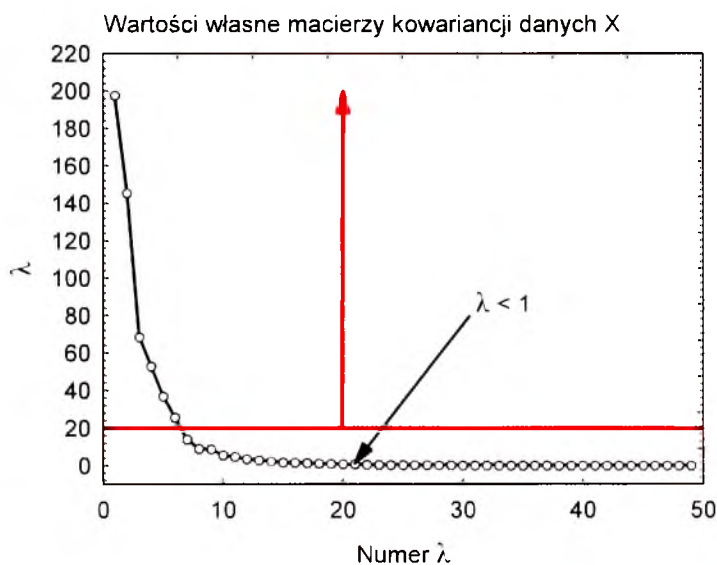
tylko kilka pierwszych PC, które wyjaśniają większość wariancji w danych. Transformacja macierzy \mathbf{X} przy użyciu kilku składowych głównych pociąga za sobą utratę części informacji zawartej w danych, stąd równanie (5.1) po uwzględnieniu wprowadzonego w ten sposób błędu, przybiera postać:

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E} \quad (5.8)$$

gdzie \mathbf{E} jest macierzą resztkową.

Istnieje kilka reguł pomocnych w wyborze odpowiedniej liczby składowych głównych, jednakże zazwyczaj jest to decyzja arbitralna, uzależniona od złożoności danych. Dwie najczęściej stosowane reguły to:

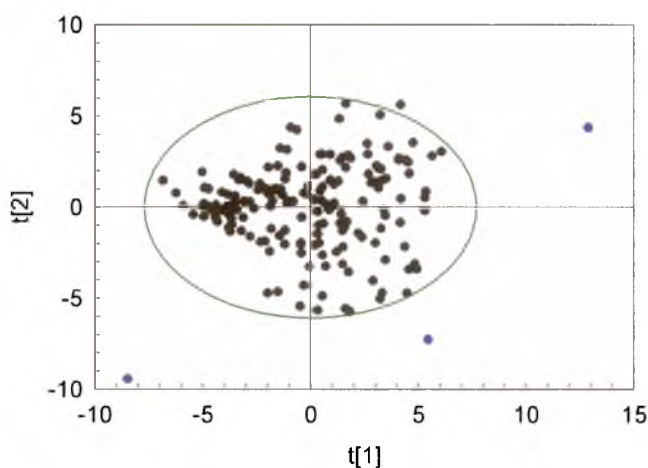
- Kryterium Kaisera [Kaiser 1960] – wykorzystywane są tylko składowe główne o wartościach własnych $\lambda \geq 1$, czyli te, które stanowią przynajmniej ekwiwalent pojedynczej oryginalnej zmiennej.
- Wykres ospiska [Cattel 1966] – wykorzystywane są składowe główne na lewo od miejsca, w którym wykres ospiska załamuje się w prawą stronę. Z przykładu przedstawionego na rysunku 5.5 wynika, że zgodnie z omawianym kryterium należy wziąć pod uwagę 6 składowych głównych. Zastosowanie wykresu ospiska prowadzi do wyboru mniejszej liczby przydatnych składowych głównych niż w przypadku kryterium Kaisera.



Rysunek 5.5. Wykres ospiska wartości własnych macierzy kowariancji dla danych X. Dwadzieścia pierwszych składowych głównych ma wartości własne > 1 , jednakże kształt krzywej sugeruje wykorzystanie jedynie sześciu pierwszych składowych głównych.

5.1.4 Identyfikacja widm odstających

Rysunek 5.6 ilustruje zastosowanie metody PCA w detekcji i eliminacji ze zbiorów danych tzw. „outlierów”, czyli danych odstających od reszty, które mogą zaburzać lub utrudniać interpretację wyników. Próbką silnie odstającą od reszty na wykresie współrzędnych czynnikowych przypadków ma największy wpływ na układ oryginalnych zmiennych na wykresie ładunków. Natomiast próbka silnie odstająca od reszty, ale w kierunku innym, niż wyznaczone przez dane dwie składowe główne, jest niewystarczająco opisana poprzez rzut na płaszczyznę współrzędnych czynnikowych przypadków.



Rysunek 5.6. Wykres współrzędnych czynnikowych przypadków analizy PCA. Widma wyraźnie odstające są zaznaczone kolorem niebieskim; elipsa oznacza przedział ufności 95%.

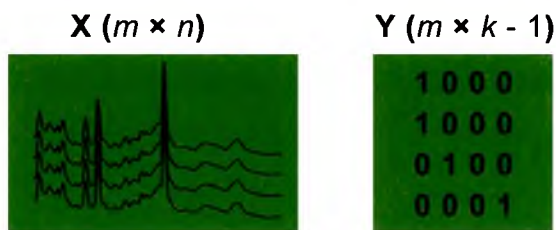
5.2 Metoda cząstkowych najmniejszych kwadratów – analiza dyskryminacyjna

Metoda cząstkowych najmniejszych kwadratów – analiza dyskryminacyjna (ang. *partial least squares – discriminant analysis*, PLS-DA) jest bezpośrednim rozwinięciem klasycznej metody PLS [Wold 1966] połączonej z elementami PCA.

Po raz pierwszy metoda PLS-DA została opisana pod koniec lat osiemdziesiątych [Sjöström 1986, Stahle 1987] jako metoda, której celem jest znalezienie i zobrazowanie maksymalnej kowariancji pomiędzy danymi wejściowymi a predefiniowaną informacją o przynależności do danej klasy. Analogicznie jak w przypadku PCA, odbywa się to poprzez liniową transformację danych wejściowych do nowego układu ortogonalnych współrzędnych, tzw. składowych ukrytych (ang. *latent components*, LC). Pierwsza składowa LC odzwierciedla maksimum zmienności pomiędzy klasami.

5.2.1 Model matematyczny PLS-DA

Niech dane wejściowe stanowią macierz \mathbf{X} o wymiarach $m \times n$, gdzie każdy z m wierszy reprezentuje pojedynczą próbkę (widmo) opisaną przez n zmiennych (przesunięć chemicznych). Informacja o przynależności do danej klasy jest zakodowana w zerojedynkowej macierzy \mathbf{Y} ($m \times k-1$), gdzie k stanowi liczbę klas. Macierze \mathbf{X} i \mathbf{Y} są przedstawione na rysunku 5.7.



Rysunek 5.7. Macierz danych \mathbf{X} oraz macierz \mathbf{Y} określająca przynależność widm do danej klasy.

Dane \mathbf{X} w nowym układzie współrzędnych są wyrażone poprzez ich liniową kombinację z macierzą wag \mathbf{W}^* (*X-weight*), której kolumny $\{\mathbf{w}_1^*, \dots, \mathbf{w}_m^*\}$ są zestawem nowych, ortogonalnych wektorów bazowych [Wold 2001]:

$$\mathbf{T} = \mathbf{XW}^* \quad (5.9)$$

Podobnie jak w PCA, współrzędne czynnikowe przypadków przemnożone przez ładunki czynnikowe są dobrym przybliżeniem \mathbf{X} :

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E} \quad (5.10)$$

ponadto, przemnożone przez wagi \mathbf{C} (*Y-weight*) „przewidują” wartość \mathbf{Y} :

$$\mathbf{Y} = \mathbf{TC}^T + \mathbf{F} \quad (5.11)$$

gdzie \mathbf{E} i \mathbf{F} są macierzami resztkowymi. Łącząc równania (5.9) oraz (5.11) otrzymamy:

$$\mathbf{Y} = \mathbf{XW}^*\mathbf{C}^T + \mathbf{F} = \mathbf{XB} + \mathbf{F} \quad (5.12)$$

Macierz \mathbf{B} jest macierzą współczynników regresji PLS odzwierciedlających relacje pomiędzy \mathbf{X} i \mathbf{Y} [Wold 2001].

Niech:

$$\begin{aligned} \mathbf{C}_X &\equiv \text{cov}(\mathbf{X}) \equiv \frac{1}{n-1} \mathbf{X}^T \mathbf{X} \\ \mathbf{C}_Y &\equiv \text{cov}(\mathbf{Y}) \equiv \frac{1}{n-1} \mathbf{Y}^T \mathbf{Y} \\ \mathbf{C}_{XY} &\equiv \text{cov}(\mathbf{XY}) \equiv \frac{1}{n-1} \mathbf{X}^T \mathbf{Y} \end{aligned} \quad (5.13)$$

będą odpowiednio macierzami kowariancji danych \mathbf{X} i \mathbf{Y} oraz kowariancji pomiędzy \mathbf{X} i \mathbf{Y} [Barker 2003, Rosipal 2006]. Macierze \mathbf{X} oraz \mathbf{Y} zostały uprzednio scentrowane.

Do wyznaczenia wektorów \mathbf{w}^* metody PLS wykorzystują algorytm NIPALS (ang. *nonlinear iterative partial least squares*) bazujący na przedstawieniu powiązania kowariancji ze współczynnikiem korelacji Pearsona w następujący sposób:

$$[\mathbf{C}_{\mathbf{XY}}]^2 \equiv [\text{cov}(\mathbf{XY})]^2 = \text{cov}(\mathbf{Xa})[\text{corr}(\mathbf{XaYb})]^2 \text{cov}(\mathbf{Yb}) \quad (5.14)$$

przez co można traktować PLS jako formę analizy korelacji kanonicznej (ang. *canonical correlation analysis*, CCA), w której kryterium maksymalnej korelacji jest równoważone przez równoczesne żądanie znalezienia jak największej wariancji zarówno w danych \mathbf{X} , jak i \mathbf{Y} .

W przypadku PLS-DA wariancja danych w macierzy klas (\mathbf{Y}) nie ma istotnego znaczenia, dlatego może zostać przeniesiona na drugą stronę równania (5.14), które przyjmuje teraz postać [Barker 2003]:

$$\frac{[\text{cov}(\mathbf{XY})]^2}{\text{cov}(\mathbf{Y})} = \text{cov}(\mathbf{X})[\text{corr}(\mathbf{XY})]^2 \quad (5.15)$$

A następnie:

$$\frac{[\text{cov}(\mathbf{XY})]^2}{\text{cov}(\mathbf{Y})} = \frac{\frac{1}{(n-1)^2} \mathbf{X}^T \mathbf{Y} \mathbf{Y}^T \mathbf{X}}{\frac{1}{n-1} \mathbf{Y}^T \mathbf{Y}} = \frac{1}{(n-1)} \mathbf{X}^T \mathbf{Y} (\mathbf{Y}^T \mathbf{Y})^{-1} \mathbf{Y}^T \mathbf{X} \quad (5.16)$$

Ponieważ CCA zakłada otrzymanie maksymalnej wartości korelacji, to na mocy równania (5.15) oraz ilorazu Rayleigha [Rayleigh 1870] problem sprowadza się do rozwiązania równania własnego [Barker 2003, Rosipal 2006]:

$$\frac{1}{(n-1)} \mathbf{X}^T \mathbf{Y} (\mathbf{Y}^T \mathbf{Y})^{-1} \mathbf{Y}^T \mathbf{X} \mathbf{w}^* = \mathbf{H} \mathbf{w}^* = \lambda \mathbf{w}^* \quad (5.17)$$

gdzie:

$$\frac{1}{(n-1)} \mathbf{X}^T \mathbf{Y} (\mathbf{Y}^T \mathbf{Y})^{-1} \mathbf{Y}^T \mathbf{X} = \mathbf{H} \quad (5.18)$$

którego rozwiązaniem jest wektor \mathbf{w}^* odpowiadający największej wartości własnej macierzy \mathbf{H} złożonej z sum kwadratów pomiędzy klasami. Wektor ten odpowiada pierwszej składowej ukrytej \mathbf{w}_1^* .

Ponieważ PLS-DA jest metodą iteracyjną, do wyliczenia kolejnego wektora \mathbf{w}^* wykorzystuje się macierz resztkową \mathbf{E}_1 powstałą po zmniejszeniu o jeden rzędu macierzy \mathbf{X} :

$$\mathbf{E}_1 = \mathbf{X} - \mathbf{t}_1 \mathbf{p}_1^T \quad (5.19)$$

gdzie:

$$\mathbf{p}_1 = \mathbf{X}^T \mathbf{t}_1 \left(\mathbf{t}_1^T \mathbf{t}_1 \right)^{-1} \quad (5.20)$$

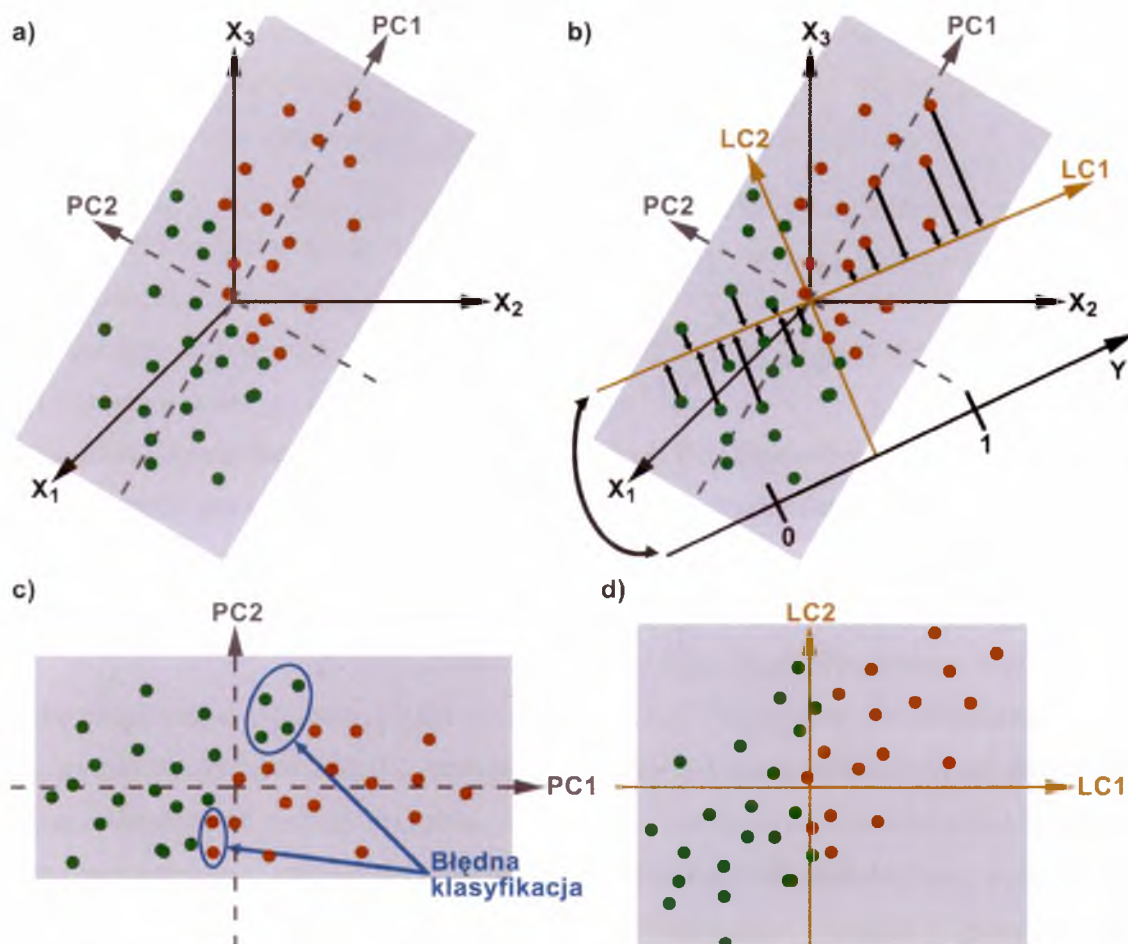
a $\mathbf{X} = \mathbf{E}_0$. Następnie macierz \mathbf{E}_1 zastępuje macierz \mathbf{X} w równaniu własnym (5.17), aby później służyć jako baza do odjęcia kolejnego komponentu, i tak aż do wyczerpania rzędu macierzy \mathbf{X} [Rosipal 2006].

5.2.2 Interpretacja geometryczna PLS-DA

PLS-DA również jest metodą projekcji. Analogicznie jak w PCA, najpierw znajduje się A wymiarowa powierzchnia określona przez składowe główne, która w możliwie dokładny sposób przybliża wariancję danych. Następnie PLS-DA znajduje na tej płaszczyźnie kierunek określony przez pierwszą składową ukrytą odzwierciedlającą największą korelację \mathbf{X} z \mathbf{Y} , co ilustruje rysunek 5.8.

Mając drugą składową ukrytą można zdefiniować dwuwymiarową płaszczyznę. Współrzędne punktów rzutowanych na płaszczyznę zdefiniowaną przez dwie składowe ukryte znajdują się w kolumnach macierzy \mathbf{T} .

Ponieważ wektory \mathbf{p} nie są ortogonalne (algorytm PLS-DA nie zakłada ich ortogonalności), wyniki interpretowane są na podstawie analizy wykresów współrzędnych czynnikowych przypadków oraz wag \mathbf{w}^* (ang. *X-weight plot*), które odzwierciedlają strukturę korelacji pomiędzy \mathbf{X} i \mathbf{Y} .



Rysunek 5.8. Rysunek a: Dwie składowe główne tworzą płaszczyznę będącą oknem w n wymiarowej przestrzeni. Rysunek b: Składowe ukryte (LC) wyznaczają nowe kierunki na powyższej płaszczyźnie. Kierunek pierwszej składowej ukrytej dobierany jest tak, aby w jak największym stopniu odzwierciedlać korelację pomiędzy X i Y zachowując możliwie dużo informacji o wewnętrznej strukturze danych. Rysunek c: Rzut widm na płaszczyznę rozpiętą na składowych głównych (PCA) prowadzi do błędnej klasyfikacji niektórych przypadków (wewnętrzna wariancja danych nie pokrywa się z predefiniowaną informacją o przynależności do danej klasy). Rysunek d: Po rzutowaniu widm na płaszczyznę rozpiętą na składowych ukrytych (PLS-DA) brak jest przypadków o wyraźnie błędnej klasyfikacji.

5.2.3 Jakość modelu PLS-DA oraz liczba wyodrębnionych składowych ukrytych

Jakość modelu PLS-DA określona jest przez trzy parametry. Są to:

- suma kwadratów danych X wyjaśniona przez wyodrębnione składowe ukryte:

$$R^2X = 1 - \frac{\sum (x_{\text{zaobserwowane}} - x_{\text{obliczone}})^2}{\sum (x_{\text{zaobserwowane}} - x_{\text{średnie}})^2} \quad (5.21)$$

- suma kwadratów danych Y wyjaśniona przez wyodrębnione składowe ukryte:

$$R^2Y = 1 - \frac{\sum (y_{\text{zaobserwowane}} - y_{\text{obliczone}})^2}{\sum (y_{\text{zaobserwowane}} - y_{\text{średnie}})^2} \quad (5.22)$$

- zdolność predykcyjna modelu, określona przez sumę kwadratów błędu predykcji dla wszystkich wyodrębnionych składowych:

$$Q^2 = 1 - \frac{\sum (y_{\text{zaobserwowane}} - y_{\text{przewidziane}})^2}{\sum (y_{\text{zaobserwowane}} - y_{\text{średnie}})^2} \quad (5.23)$$

Podobnie jak w przypadku PCA, liczba możliwych do wyodrębnienia składowych ukrytych zależy od rzędu macierzy X , jednakże tym razem dobór odpowiedniej ich liczby jest sprawą kluczową dla zapewnienia poprawnego funkcjonowania modelu.

Zapewnienie równowagi pomiędzy ilością wyjaśnionej wariancji X a zdolnością predykcyjną modelu odbywa się podczas procesu walidacji modelu.

Spośród kilku dostępnych metod walidacji najpopularniejszy jest sprawdzian krzyżowy „*leave one out*” (ang. *leave one out cross validation*, CV-LOO). W pierwszym kroku jedno widmo (wiersz) zostaje wykluczone ze zbioru danych X , następnie model zbudowany na pozostałych widmach jest wykorzystywany do przewidzenia klasy wykluczonego widma i określona zostaje zdolność predykcyjna modelu Q^2 dla wszystkich składowych ukrytych. Ta procedura jest powtarzana, aż do momentu, kiedy każde widmo zostało wykluczone jeden i tylko jeden raz. Następnie wartości Q^2 są sumowane po wszystkich utworzonych modelach, i jeżeli wartość dla danej składowej ukrytej przekracza zadany próg, to składowa ta jest istotna. Za próg istotności przyjmuje się 0 (jeżeli model zawiera powyżej 100 próbek) lub 0,05 (dla modeli o 100 lub mniej próbkach).

5.2.4 Istotność zmiennych wejściowych

Istotność zmiennych wejściowych na wykresach ładunków czynnikowych przypadków oraz wag w^* jest zwykle oceniana wzrokowo – im dalej od środka wykresu leży dana zmienna, tym jest ona bardziej istotna. Taka ocena w dużej mierze zależy od doświadczenia oraz wiedzy operatora o charakterze analizowanych danych. W przypadku danych spektroskopowych *in vivo* konieczne jest zrozumienie mechanizmu powstawania sygnałów rezonansowych poszczególnych metabolitów oraz charakteru zaburzeń widma rezonansowego. Dodatkowo model PLS-DA pozwala na określenie istotności zmiennych wejściowych (ang. *variable importance*, VIP) na podstawie wartości bezwzględnej wag

w^* , dla danej zmiennej, przemnożonej przez wartość R^2Y dla danej składowej ukrytej – co pozwala na weryfikację metody wzrokowej. Przyjmuje się, że wartość $VIP > 1$ pozwala na uznanie danej zmiennej za istotną w odwzorowaniu macierzy Y .

5.2.5 Ortogonalna korekcja sygnału

Ortogonalna korekcja sygnału (ang. *orthogonal signal correction*, OSC) jest filtrem spektralnym dedykowanym dla metod PLS, który usuwa ze zmiennych wejściowych zewnętrzną wariancję – ortogonalną do Y .

Pierwszym krokiem w oryginalnym algorytmie OSC, opisanym przez Svante Wolda [Wold 1998], jest konstrukcja modelu PCA dla danych X . Otrzymany wektor t_1 jest ortogonalizowany względem Y :

$$t_1^{osc} = \left(1 - Y(Y^T Y)^{-1} Y^T \right) t_1 \quad (5.24)$$

następnie zostaje wyliczony wektor wag w_1^* (5.17). Służy on do wykonania testu zbieżności algorytmem NIPALS, przeprowadzanego w celu upewnienia się, że uprzednio ortogonalizowany wektor t jest zbieżny z kierunkiem najdłuższego wektora ortogonalnego do Y , który w dalszym ciągu jest dobrym przybliżeniem X .

Po uzyskaniu zbieżności wyliczany jest wektor ładunków czynnikowych p_1^{osc} (5.20) oraz macierz reszkowa E_1^{osc} (5.19), która stanowi zbiór danych wejściowych do wyliczenia kolejnego komponentu OSC ($t^{osc} p^{oscT}$). Macierz E_A^{osc} otrzymana po odjęciu A komponentów OSC (odfiltrowana macierz X) stanowi, razem z macierzą Y , zestaw danych wejściowych dla właściwej analizy PLS-DA.

Ponieważ opisany powyżej algorytm OSC jest bardzo czuły na obecność w zestawie danych widm odstających, po każdym odjęciu komponentu OSC należy analizować rozkład wariancji otrzymanej macierzy reszkowej, np. przy pomocy metody PCA. Kolejnym ograniczeniem dla OSC jest możliwość nadmiernego dopasowania (ang. *overfitting*) do Y , dlatego niewskazane jest odejmowanie zbyt dużej liczby komponentów OSC. Za istotne przyjmuje się jedynie te komponenty OSC, dla których wartość $R^2OSC > 2/\min(m,n)$, gdzie m i n są wymiarami macierzy X .

Graficznie ideę techniki OSC można zilustrować rysunkiem 5.9, na którym po lewej stronie widoczny jest kształt przypominający głowę. Po usunięciu szumów, tj. informacji niezwiązanej z poszukiwanymi przez nas właściwościami badanego obrazu, ujawnia się prawdziwa natura danych.



Rysunek 5.9. Graficzne przedstawienie idei ortogonalnej korekcji sygnału (OSC).

Oryginalne zdjęcie (po prawej stronie) należy do domeny publicznej, zostało pobrane ze strony <http://www.coolopticalillusions.com/eye-tricks/tree-head-illusion.htm>, dnia 13-11-2007.

5.3 Sztuczne sieci neuronowe, perceptron wielowarstwowy

Perceptron wielowarstwowy (ang. *multilayer perceptron*, MLP) jest najpopularniejszą i najbardziej uniwersalną nieliniową sztuczną siecią neuronową (ang. *artificial neural network*, ANN). Nazwa *perceptron* pochodzi od Rosenblatta [Rosenblatt 1958], psychologa i neobehawiorysty, którego pasją było wyjaśnienie za pomocą sieci neuronowych fundamentalnych związków pomiędzy bodźcami i reakcjami na nie.

ANN są adaptacyjnym narzędziem do przetwarzania informacji, wykorzystującym zasady funkcjonowania biologicznego systemu nerwowego. Podstawowym elementem ANN jest sztuczny neuron (ang. *artificial neuron*), do którego wejść doprowadzane są sygnały pochodzące z zewnątrz (dane wejściowe do obliczeń) albo sygnały pośrednie (pochodzące z wyjść innych neuronów wchodzących w skład sieci). Każdy sygnał mnożony jest przez odpowiadający mu współczynnik liczbowy, tzw. wagę (w_n), który wpływa na percepcję danego sygnału wejściowego i jego udział w tworzeniu sygnału wyjściowego przez neuron [Tadeusiewicz 1993].

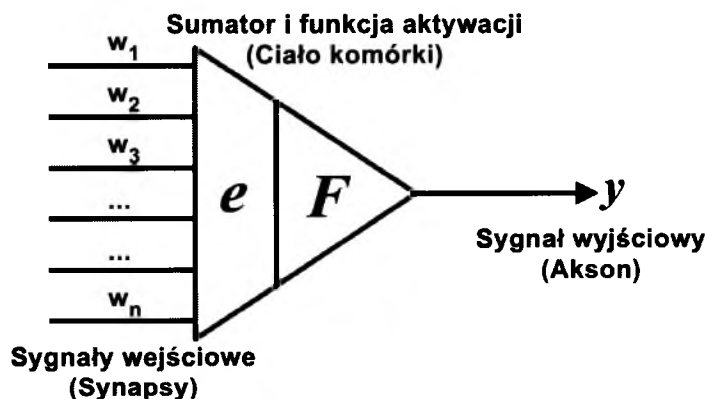
Suma wszystkich sygnałów docierających do neuronu przemnożonych przez odpowiadające im wagi odpowiada łącznemu pobudzeniu neuronu:

$$e = \sum_n w_n x_n + x_0 w_0 \quad (5.25)$$

gdzie x_0 jest stałym składnikiem umożliwiającym przesuwanie progu aktywacji neuronu, składnik ten nosi nazwę *bias*. Amplituda sygnału wyjściowego neuronu jest kontrolowana przez funkcję aktywacji F (która w MLP jest funkcją nieliniową):

$$y = F(e) \quad (5.26)$$

Schemat działania sztucznego neuronu ilustruje rysunek 5.10.



Rysunek 5.10. Schemat działania sztucznego neuronu.

5.3.1 Nieliniowe funkcje aktywacji

Zadaniem funkcji aktywacji jest przekształcenie sygnału pobudzenia neuronu tak, aby sygnał wyjściowy zawierał się pomiędzy określonymi wartościami (zazwyczaj pomiędzy 0 i 1 lub -1 i 1).

Spośród szerokiego zakresu możliwych do zastosowania funkcji aktywacji wyróżnić można trzy główne grupy [Rojas 1996]:

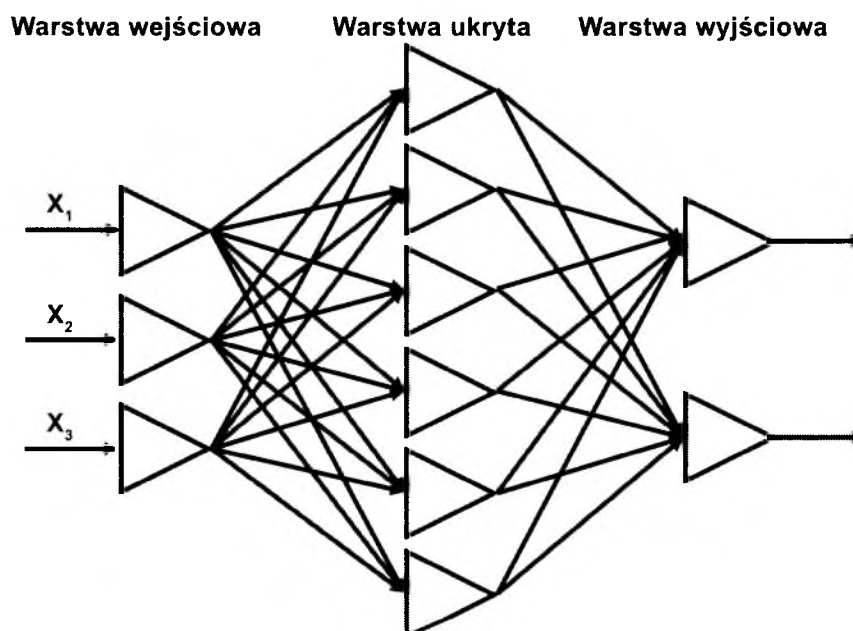
- Sigmoidalna – funkcje charakteryzujące się słabą nieliniowością, takie jak funkcja logistyczna czy funkcja hiperboliczna, których wartości wyjściowe mieszczą się odpowiednio w przedziałach (0,1) i (-1,1).
- Progowa – funkcja o silnej nieliniowości i wartościach wyjściowych wynoszących wyłącznie 1 lub 0 dla dodatniej lub ujemnej wartości łącznego pobudzenia neuronu.
- Liniowa z nasyceniem – odcinkami liniowa wersja funkcji sigmoidalnej, zazwyczaj złożona z trzech odcinków. Wartości wyjściowe mieszczą się w przedziałach (0,1) lub (-1,1).

Funkcja logistyczna, z racji charakterystyki najbliższej rzeczywistym biologicznym neuronom, oraz funkcja hiperboliczna (tangens hiperboliczny), ze względu na swoją symetrię, są najczęściej wykorzystywane jako funkcje aktywacji w ANN [Rojas 1996].

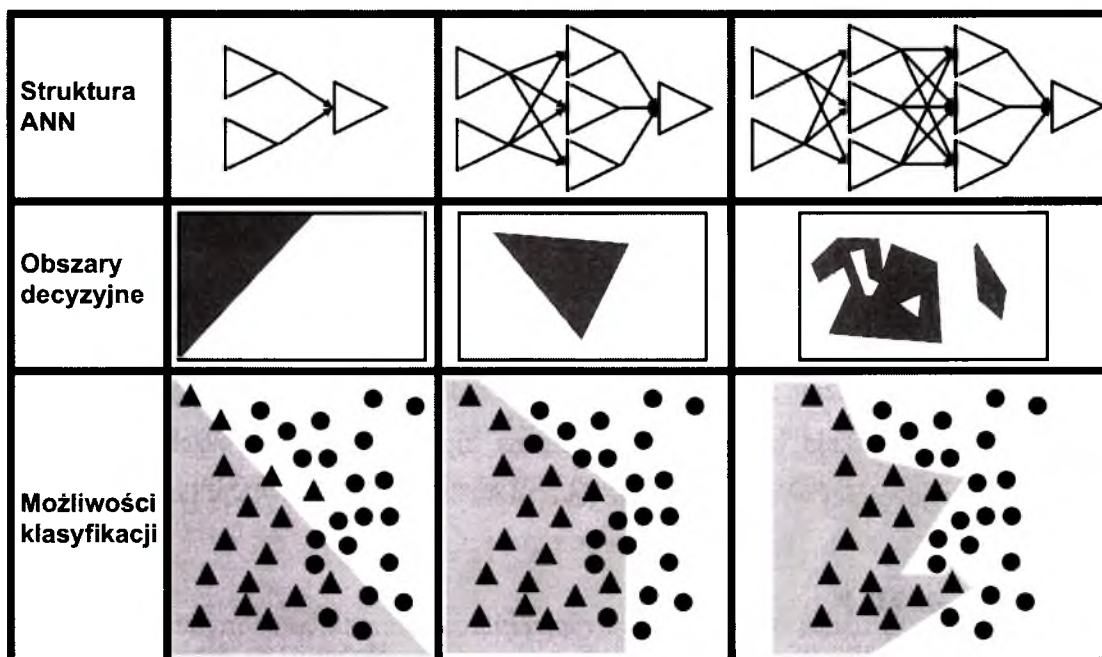
5.3.2 Topologia MLP

W perceptronie wielowarstwowym neurony są ułożone w trzech lub więcej warstwach, warstwy wewnętrzne są warstwami ukrytymi (ang. *hidden layers*). Wszystkie warstwy są całkowicie połączone, co oznacza, że wyjście każdego neuronu (poza ostatnim neuronem wyjściowym sieci) jest połączone z wejściami wszystkich neuronów kolejnej warstwy.

Topologia MLP jest opisywana poprzez liczbę neuronów w każdej warstwie, czyli sieć 3:6:2 posiada trzy neurony w warstwie wejściowej, sześć w warstwie ukrytej oraz dwa neurony wyjściowe. Schemat MLP 3:6:2 jest przedstawiony na rysunku 5.11.



Rysunek 5.11. Schemat sieci MLP 3:6:2.



Rysunek 5.12. Kształty obszarów decyzyjnych oraz graficzne przedstawienie możliwości klasyfikacyjnych sieci neuronowych w zależności od stopnia złożoności sieci. Sieci złożone z dwóch warstw ukrytych potrafią odwzorować skomplikowane regularności w zestawach danych.

W zależności od liczby warstw ukrytych ANN jest w stanie rozpoznawać coraz to bardziej skomplikowane regularności w zestawach danych. I tak sieć dwuwarstwowa dzieli przestrzeń n wymiarową za pomocą hiperpłaszczyzny (w przypadku dwóch wymiarów jest to linia prosta). Każda kolejna warstwa dodaje nowe hiperpłaszczyzny, dzięki czemu możliwe jest rozpoznawanie dowolnych regularności [Tadeusiewicz 1993]. Możliwości te ilustruje rysunek 5.12.

Liczba neuronów wejściowych odpowiada liczbie zmiennych opisujących przypadki natomiast liczba neuronów wyjściowych zależy od rodzaju zadania postawionego przed ANN, dla sieci klasyfikujących liczba neuronów wyjściowych zazwyczaj odpowiada liczbie klas, przy czym dla dwóch klas (reprezentacja dwustanowa) na wyjściu sieci znajduje się jeden neuron. Liczba warstw i neuronów ukrytych jest dobierana odpowiednio do stopnia złożoności badanego problemu. W rzeczywistych zastosowaniach sieci neuronowe rzadko mają więcej niż jedną warstwę ukrytą [Masters 1993].

5.3.3 Uczenie MLP

Proces uczenia perceptronu wielowarstwowego MLP ma doprowadzić do tego, aby dla zadanego zbioru danych wejściowych sieć podawała pożądany zestaw sygnałów wyjściowych. Innymi słowy nauczona sieć neuronowa ma wykonywać taką czynność, jakiej od niej wymagamy. Jest to tzw. uczenie z nauczycielem (ang. *supervised learning*), co oznacza, że do uczenia sieci potrzebny jest zestaw danych wejściowych wraz z oczekiwanymi wartościami wyjściowymi, czyli, ciąg uczący:

$$U = \left\langle \langle \mathbf{x}^1 \mathbf{z}^1 \rangle, \langle \mathbf{x}^2 \mathbf{z}^2 \rangle, \dots, \langle \mathbf{x}^n \mathbf{z}^n \rangle \right\rangle \quad (5.27)$$

gdzie: n – liczba przypadków uczących, \mathbf{z}^i – k -elementowy wektor oznaczający wymagane zestawy odpowiedzi sieci na dane wejściowe zadane odpowiednimi wektorami \mathbf{x}^i . Obiektem uczenia w ANN jest macierz wag \mathbf{W}_k . Każdy neuron sieci rozpoczyna uczenie z pewnym przypadkowym zestawem wag (predyspozycje wrodzone neuronu) i stopniowo polepsza te wagi w każdym kroku procesu uczenia (po prezentacji każdego z przypadków uczących), przy czym neuron sam potrafi określić, które ze swoich wag (oraz w jaki sposób i o jaką wartość) modyfikować [Tadeusiewicz 1993]. Wagi są dopasowywane tak, aby zminimalizować funkcję błędu średniokwadratowego pomiędzy oczekiwaną wartością wyjściową a wartością podaną przez neuron wyjściowy.

Dla pojedynczego neuronu i -ty współczynnik wagowy w $j+1$ kroku uczenia podlega modyfikacji zgodnie ze wzorem [Rojas 1996]:

$$w_i^{j+1} - w_i^j = \Delta w_i^j = -\eta \frac{\partial}{\partial w_i} \frac{1}{2} (z^j - y^j)^2 = -\eta \frac{\partial Q^j}{\partial w_i} \quad (5.28)$$

gdzie η jest współczynnikiem liczbowym odpowiadającym szybkości uczenia ANN. Funkcja błędu średniokwadratowego Q jest zależna od odpowiedzi na wyjściu sieci, ponadto zależność sygnałów wyjściowych y od wag ma uwikłany charakter uwzględniający nieliniową funkcję aktywacji neuronu:

$$\frac{\partial Q^j}{\partial w_i} = \frac{\partial Q^j}{\partial y^j} \frac{\partial y^j}{\partial w_i} = \frac{\partial Q^j}{\partial y^j} \frac{\partial y^j}{\partial e^j} \frac{\partial e^j}{\partial w_i} = \frac{\partial Q^j}{\partial y^j} \frac{\partial F(e^j)}{\partial e^j} \frac{\partial e^j}{\partial w_i} \quad (5.29)$$

Pochodna pierwszego członu jest następująca:

$$\frac{\partial Q^j}{\partial y^j} = -(z^j - y^j) \quad (5.30)$$

Pochodna trzeciego członu (na podstawie wzoru 5.25) przyjmuje postać:

$$\frac{\partial e^j}{\partial w_i} = x_i^j \quad (5.31)$$

Pochodna drugiego członu zależy od funkcji aktywacji neuronu:

$$\text{- dla funkcji logistycznej: } \frac{\partial F(e^j)}{\partial e^j} = y^j (1 - y^j) \quad (5.32)$$

$$\text{- dla funkcji tanh: } \frac{\partial F(e^j)}{\partial e^j} = 1 - (y^j)^2 \quad (5.33)$$

Ponieważ w sieciach wielowarstwowych znana jest jedynie wartość błędu dla neuronów warstwy wyjściowej, błędy popełniane przez poszczególne neurony warstw poprzednich muszą zostać „odgadnięte”. Najpopularniejszym algorytmem uczenia jest algorytm wstecznej propagacji błędu (ang. *error backpropagation*, EBP). W algorytmie EBP najpierw wyliczany jest błąd dla warstwy wyjściowej, a następnie błąd dla neuronów warstw poprzednich obliczany jest jako funkcja błędów neuronów warstwy poprzedzającej, po czym następuje modyfikacja wag dla neuronów z dużą wartością błędu.

Propagacja błędu od neuronów warstwy wyjściowej do neuronów ostatniej warstwy ukrytej przebiega w następujący sposób [Rojas 1996]:

1. Obliczany jest sygnał wyjściowy m -tego neuronu warstwy wyjściowej w j -tym kroku uczenia:

$$y_m^j = F\left(\sum_{i=1}^p w_{mi}^j y_i^j + x_0 w_0^j\right) \quad (5.34)$$

gdzie y_i^j jest sygnałem wyjściowym i -tego neuronu warstwy ukrytej w j -tym kroku uczenia.

2. Wyznaczana jest wartość błędu dla m -tego neuronu warstwy wyjściowej w j -tym kroku uczenia:

$$Err_m^j = (z_m - y_m^j) \quad (5.35)$$

gdzie z_m jest wzorcem poprawnej odpowiedzi dla tego neuronu.

3. Wyznaczana jest wartość błędu na wejściu m -tego neuronu warstwy wyjściowej w j -tym kroku uczenia:

$$In-Err_m^j = Err_m^j \cdot \frac{\partial F(e_m^j)}{\partial e_m^j} = (z_m - y_m^j) \frac{\partial F(e_m^j)}{\partial e_m^j} \quad (5.36)$$

gdzie e_m^j jest całkowitym pobudzeniem tego neuronu.

4. Propagacja błędu wyznaczonego w pkt. 3 do neuronów ostatniej warstwy ukrytej:

$$\delta_i^j = \sum_{m=1}^r w_{mi}^j In-Err_m^j \quad (5.37)$$

gdzie δ_i^j jest rzutowanym wstecznie błędem na wyjściu i -tego neuronu warstwy ukrytej.

5. Wyznaczana jest wartość błędu na wejściu i -tego neuronu warstwy ukrytej w j -tym kroku uczenia:

$$In-Err_i^j = \delta_i^j \frac{\partial F(e_i^j)}{\partial e_i^j} \quad (5.38)$$

gdzie e_i^j jest całkowitym pobudzeniem tego neuronu.

6. Korekcja współczynników wagowych m -tego neuronu warstwy wyjściowej w j -tym kroku uczenia:

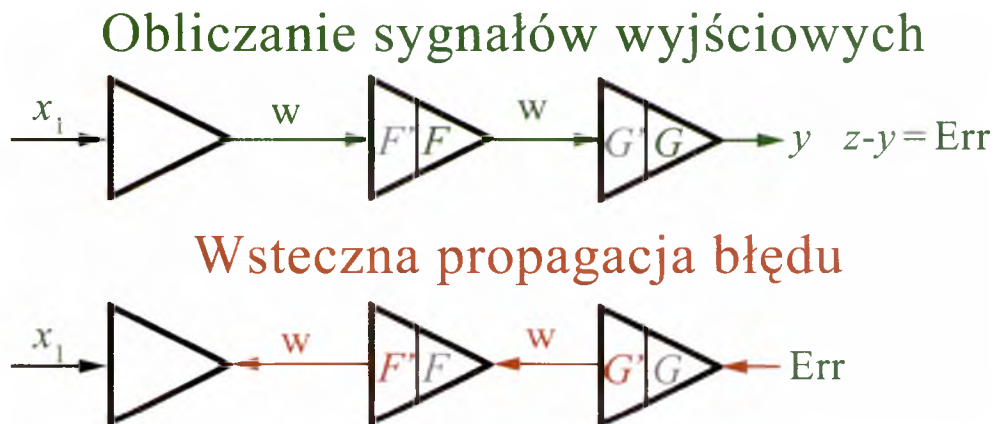
$$w_{mi}^{j+1} - w_{mi}^j = \Delta w_{mi}^j = \eta (z_m - y_m^j) \frac{\partial F(e_m^j)}{\partial e_m^j} y_i^j = \eta Err_m^j \cdot \frac{\partial F(e_m^j)}{\partial e_m^j} y_i^j \quad (5.39)$$

gdzie w_{mi} są wagami dla sygnału pochodzącego od i -tego neuronu warstwy ukrytej i docierającego do m -tego neuronu warstwy wyjściowej.

7. Korekcja współczynników wagowych i -tego neuronu warstwy ukrytej w j -tym kroku uczenia:

$$w_{ik}^{j+1} - w_{ik}^j = \Delta w_{ik}^j = \eta \delta_i' \frac{\partial F(e_i')}{\partial e_i'} x_k^j = \eta In-Err_i' x_k^j \quad (5.40)$$

gdzie w_{ik} są wagami dla sygnału pochodzącego od k -tego neuronu warstwy wejściowej i docierającego do i -tego neuronu warstwy ukrytej, a x_k^j jest sygnałem podawanym na k -ty neuron warstwy wejściowej.



Rysunek 5.13. Uproszczony schemat przebiegu procesu uczenia MLP opartego na algorytmie wstecznej propagacji błędu. Sygnał wejściowy jest przetwarzany przez neurony ukryte i dociera do neuronów wyjściowych. Następnie obliczany jest błąd popełniony przez każdy z neuronów wyjściowych, który w kolejnym kroku jest przetwarzany na błąd na wejściu neuronów wyjściowych. W tym momencie następuje wsteczna propagacja błędu na wejściu neuronu wyjściowego do neuronów warstwy ukrytej.

Na rysunku 5.13 przedstawiono uproszczony przebieg procesu uczenia opartego na algorytmie wstecznej propagacji błędu dla sieci z jedną warstwą ukrytą. Podczas obliczania sygnałów wyjściowych każdy neuron przechowuje w swojej *pamięci* wynik działania funkcji aktywacji oraz wartość jej pochodnej względem tego samego całkowitego pobudzenia neuronu. Proces wstecznej propagacji błędu odbywa się po tej samej trasie, którą dotarły sygnały do neuronu warstwy wyjściowej, jednakże w przeciwnym kierunku. Iloczyn błędu na wyjściu danego neuronu wyjściowego i zapamiętanej pochodnej funkcji aktywacji tego neuronu (błąd na wejściu neuronu wyjściowego, równanie 5.36)) jest mnożony przez te same współczynniki wagowe, przez które mnożone były sygnały docierające do tego neuronu, i zostaje przekazany na wyjście neuronów warstwy ukrytej. W warstwie ukrytej błąd na wyjściu neuronu jest znów

przeliczany na błąd na jego wejściu. Po wyliczeniu wszystkich błędów neurony przystępują do modyfikacji swoich współczynników wagowych.

Przejsie sygnału wejściowego przez całą strukturę sieci oraz korekcja współczynników wagowych w danym kroku uczenia kończy pojedynczą iterację procesu uczenia sieci. Powtórzenie tej procedury iteracyjnej dla wszystkich dostępnych przypadków uczących nazywane jest epoką uczenia.

Algorytm EBP wykazuje dużą skuteczność uczenia, ale jest bardzo powolny. Dlatego też stosuje się czasem jego uproszczoną wersję w postaci algorytmu szybkiej propagacji (ang. *fast propagation algorithm*) lub szereg innych algorytmów, takich jak metoda gradientów sprzężonych lub metoda Levenberga-Marquardta. Jednakże powyższe algorytmy wykazują wysoką skuteczność jedynie wówczas, gdy problem postawiony przed siecią neuronową spełni szereg założeń matematycznych, co nie jest potrzebne w przypadku algorytmu EBP [Podręcznik elektroniczny oprogramowania STATISTICA 7.1].

5.3.4 Jakość sieci neuronowej

Podczas uczenia sieci MLP zbiór przypadków uczących sieć dzieli się na podzbiory uczący, walidacyjny i testowy [Ripley 1996]:

- Podzbiór uczący jest wykorzystywany do uczenia sieci – minimalizacji błędu na wyjściu sieci poprzez korekcję współczynników wagowych.
- Podzbiór walidacyjny daje możliwość sprawdzenia czy wybrano dobrą architekturę sieci oraz odpowiednie parametry uczenia.
- Podzbiór testowy sprawdza zdolność generalizacji nauczanej sieci (prawidłowego rozpoznawania przypadków, które nie były wykorzystywane do uczenia sieci w danej epoce, ale pochodzących z tej samej rodziny co przypadki uczące).

W procesie uczenia przypadki z podzbioru walidacyjnego są podawane na wejścia sieci razem z przypadkami uczącymi, natomiast sprawdzenie zdolności generalizacji sieci za pomocą podzbioru testowego odbywa się po zakończeniu każdej epoki uczenia. Przed przystąpieniem do uczenia, współczynniki wagowym wszystkich neuronów sieci przypisuje się niewielkie wartości losowe (o rozkładzie równomiernym lub normalnym), co stanowi proces inicjalizacji sieci i określa tak zwane predyspozycje wrodzone neuronów. Ponieważ te „wrodzone” predyspozycje prawie nigdy nie są dopasowane do realizacji postawionego przed siecią problemu, błędy uczenia i walidacji są duże

w pierwszych epokach uczenia. Wraz z postępem procesu uczenia oba te błędy maleją (na początku bardzo zdecydowanie, a w końcowej fazie uczenia zmieniają się o niewielkie wartości), jednakże kiedy sieć zbyt dokładnie dopasowuje się do przypadków uczących (np. ze względu na nieodpowiednio dobraną do postawionego problemu strukturę), zwiększa się błąd walidacji (przy stałym lub malejącym błędzie uczącym). Jest to jeden z sygnałów do zatrzymania uczenia sieci.

Jedną z najczęściej wybieranych funkcji błędu jest błąd NRMSE (ang. *normalized root mean squared error*) czyli poddany normalizacji pierwiastek z błędu średniokwadratowego:

$$\text{NRMSE} = \frac{\sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (z_i - y_i)^2}}{\sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (z_i - \bar{z})^2}} \quad (5.41)$$

Wartość błędu NRMSE dla uczenia, walidacji i testowania jest jednym z kryteriów oceny jakości sieci. Drugim kryterium jest struktura sieci – z dwóch sieci o zbliżonych wartościach błędów wybierana jest ta o prostszej strukturze.

Najważniejszym kryterium oceny jakości sieci jest zdolność do generalizacji sprawdzana na zewnętrznym zbiorze testowym złożonym z przypadków, które nie brały udziału w procesie uczenia sieci. Zawsze wybierana jest sieć o największej liczbie poprawnych odpowiedzi po podaniu na jej wejście przypadków z zewnętrznego zbioru testowego.

5.3.5 Optymalizacja procesu uczenia sieci

- Liczba neuronów ukrytych

Od liczby neuronów ukrytych zależy jakość sieci. Gdy jest ich zbyt mało, sieć nie jest w stanie odwzorować zależności, jakie występują w zbiorze uczącym. Gdy jest ich zbyt dużo, sieć jest zbyt „inteligentna” dla postawionego jej problemu i zamiast dobrze generalizować swoją wiedzę, po prostu uczy się odwzorowywać podzbiór uczący. Jedną z metod oszacowania odpowiedniej liczby neuronów ukrytych jest zastosowanie wzoru:

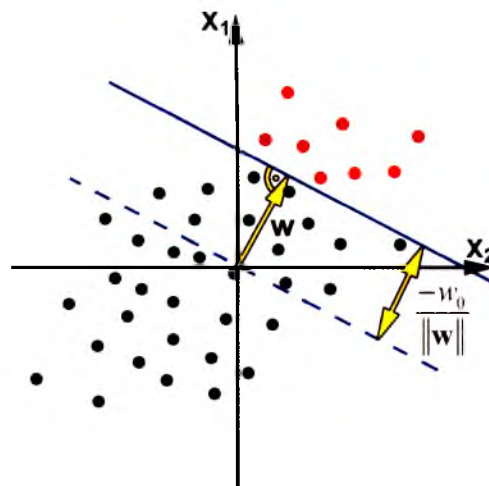
$$\text{Neurony ukryte} = \sqrt{\text{neurony wejściowe} \cdot \text{neurony wyjściowe}} \quad (5.42)$$

Wzór ten nie uwzględnia jednak stopnia skomplikowania postawionego przed siecią zadania [Masters 1993]. Metodą najdokładniejszą, ale jednocześnie bardzo czasochłonną jest metoda prób i błędów, w której zaczyna się od najmniejszej możliwej liczby neuronów ukrytych (w zależności od skomplikowania problemu

może ich być kilka, kilkanaście, kilkadziesiąt lub kilkaset), a następnie dodaje pewną ich liczbę (proporcjonalną do liczby początkowej) i dokonuje sprawdzenia jakości sieci. Liczba neuronów ukrytych jest zwiększana tak długo, jak długo obserwowana jest poprawa jakości sieci.

- **Bias**

Parametr *bias* ma wartość stałą (najczęściej równą 1), dodatkowo może posiadać własny (podlegający uczeniu) współczynnik wagowy (równanie 5.25). Zasada działania parametru *bias* jest przedstawiona na rysunku 5.14. Niezerowy *bias* pozwala na przesuwanie progu aktywacji neuronu, co zwiększa jego możliwości adaptacyjne [Bishop 1995, Poulton 2001].



Rysunek 5.14. Wektor wagowy w zadaje w przestrzeni zmiennych wejściowych kierunek hiperpłaszczyzny decyzyjnej (wektor normalny do tej hiperpłaszczyzny), natomiast odległość tej hiperpłaszczyzny decyzyjnej od środka układu współrzędnych jest określona przez bias w_0 ($x_0 = 1$).

- **Szybkość uczenia η**

Szybkość uczenia to parametr określany poprzez wielkość kroku podczas zmian współczynników wagowych w procesie uczenia (równanie 5.28). Zbyt mała wartość η znacznie spowalnia proces uczenia, natomiast zbyt duża może spowodować, że sieć nigdy nie osiągnie minimum błędu w procesie uczenia. Szybkość uczenia może być stała lub zmieniać się (zazwyczaj η maleje) wraz z zaawansowaniem procesu uczenia. Zmienna szybkość uczenia jest preferowana ze względu na lepsze rezultaty w uczeniu sieci [Fang 2005, Moreira 1995, Rojas 1996, Tadeusiewicz 1993, Yu 1995].

- **Bezwładność α (ang. *momentum*)**

Bezwładność pozwala na skrócenie czasu uczenia poprzez wprowadzenie poprawki uwzględniającej bezwładność procesu zmiany wag do wzoru na korektę współczynników wagowych [Poulton2001, Rojas 1996]:

$$w_{mi}^{j+1} - w_{mi}^j = \Delta w_{mi}^j = \eta Err_m^j \cdot \frac{\partial F(e_m^j)}{\partial e_m^j} y_i^j + \alpha (w_{mi}^j - w_{mi}^{(j-1)}) \quad (5.43)$$

Po uwzględnieniu tej poprawki zmiany współczynników wagowych zależą od błędów popełnianych przez sieć w danym kroku uczenia oraz w kroku poprzednim. Kiedy kolejne gradienty wskazują ten sam kierunek, korekcja wag staje się coraz silniejsza, natomiast efekt pojawienia się gradientu wymuszającego korektę wag w przeciwnym kierunku jest częściowo lub całkowicie hamowany.

5.3.6 Dobór istotnych zmiennych wejściowych

Jedną z podstawowych wad ANN jest tzw. *przekleństwo wielowymiarowości*: wraz ze wzrostem liczby zmiennych w sposób nieliniowy wzrasta liczba przypadków uczących potrzebnych do efektywnego funkcjonowania sieci, ponadto obecność niektórych zmiennych może uniemożliwić przeprowadzenie efektywnego procesu uczenia. Dwa najpopularniejsze sposoby radzenia sobie z tym problemem są oparte albo na przekształceniu zmiennych wejściowych do nowego, zredukowanego układu współrzędnych z wykorzystaniem metody PCA (rozdział 5.1), albo na usunięciu z procesu uczenia zmiennych uznanych za zbędne.

Przy wykorzystaniu metody PCA zbiór przypadków uczących poddawany jest analizie składowych głównych, a następnie na wejścia sieci podawane są – zamiast oryginalnych zmiennych – współrzędne czynnikowe przypadków. Przypadki z zewnętrznego zbioru testowego nie są poddawane analizie PCA, a jedynie projekcji na hiperpłaszczyznę rozpiętą na znalezionych przez model PCA składowych głównych. Rzutowanie to polega na przemnożeniu macierzy przypadków z zewnętrznego zbioru testowego przez macierz liniowej transformacji **P** (otrzymaną podczas wykonywania analizy PCA na przypadkach ze zbioru uczącego), zgodnie ze wzorem 5.1.

Do usuwania oryginalnych zmiennych wykorzystuje się między innymi algorytm doboru cech (ang. *feature selection*, FS), których zadaniem jest usunięcie ze zbioru tych zmiennych, które w znaczny sposób pogarszają jakość sieci. Algorytm FS może być realizowany na różne sposoby, najczęściej jednak oparty jest na działaniu

probabilistycznych sieci neuronowych (ang. *probabilistic neural networks*, PNN) [Hunter 2000, Leray 1999].

W powyższej pracy zastosowano algorytm wstecznego doboru cech (ang. *backward feature selection*, BFS), który w pierwszym kroku tworzy się sieć wykorzystującą wszystkie zmienne wejściowe, następnie jedna ze zmiennych jest usuwana i sprawdzana jest jakość sieci. Proces jest powtarzany dla wszystkich zmiennych, a następnie usuwane są te, których obecność pogarsza lub nie poprawia jakości sieci. Podstawowym parametrem algorytmu BFS jest tzw. *kara za cechę*, która określa, czy podczas usuwania zmiennych istotniejsze będzie zmniejszenie ich liczby czy też zachowanie możliwie najlepszej jakości sieci. Wartość tego parametru przemnożona przez liczbę wybranych w każdym kroku zmiennych jest dodawana do błędu walidacyjnego sieci w trakcie jej uczenia i testowania; zbyt duża wartość kary za cechę może nawet spowodować usunięcie wszystkich zmiennych.

Analogicznie jak w przypadku PCA algorytm BFS jest wykonywany jedynie na zbiorze uczącym.

5.4 Wstępna obróbka danych wejściowych do analizy

Domyślnie, zarówno w PCA, jak i PLS-DA dane wejściowe X są centrowane, natomiast macierz klas Y w PLS-DA jest przeważnie dodatkowo standaryzowana. Dane wejściowe dla sieci ANN rozwiązujących problemy klasyfikacji nie są domyślnie poddawane żadnej obróbce, pod warunkiem, że są danymi numerycznymi, ponieważ tylko takie są przez ANN przetwarzane.

Centrowanie nie należy do metod skalowania, jego zadaniem jest usunięcie ze zmiennych różnych fluktuacji i pozostawienie jedynie zmienności pomiędzy próbkami, co ułatwia interpretowanie wyników. Jednakże w przypadku, kiedy zmienne opisujące próbkę w macierzy X mają różny charakter fizyczny lub znacznie różnią się wartościami, również poddaje się je standaryzacji, a następnie centrowaniu. Wtedy macierze kowariancji zostają zastąpione przez macierze korelacji.

W przypadku analizy danych spektroskopowych nadanie wszystkim zmiennym (przesunięciom chemicznym) równej istotności (każda zmienna otrzymuje odchylenie standardowe równe jeden) może prowadzić do problemów z interpretacją wyników. W efekcie standaryzacji zwiększa się również istotność błędów pomiarowych oraz może się zmniejszyć wymiar danych.

6 Cel pracy

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było określenie użyteczności zastosowania wybranych narzędzi metabonomicznych do analizy i klasyfikacji widm *in vivo* ^1H MRS oraz wskazanie preferowanej lokalizacji obszaru pomiarowego w zależności od danego problemu klasyfikacyjnego.

Analizom poddano dane spektroskopowe zebrane podczas badań kontrolnych grupy pacjentów będących po leczeniu ze względu na nowotwory tylnego dołu czaszki.

Zaproponowano wykorzystanie trzech metod analizy wielowymiarowej: analizę składowych głównych (PCA), metodę cząstkowych najmniejszych kwadratów – analizę dyskryminacyjną (PLS-DA) oraz sztuczne sieci neuronowe (ANN), wspomaganych dodatkowymi metodami filtrowania danych oraz redukcji wymiaru zmiennych. Metoda PLS-DA została również wykorzystana do porównania klasyfikacji uzyskanych z dwóch obszarów pomiarowych zlokalizowanych na granicy guza lub łoża pooperacyjnej i tkanki zdrowej oraz w tkance zdrowej, oddalonej od miejsca zmiany nowotworowej.

7 Wielowymiarowa analiza danych spektroskopowych

Guzy OUN są jednymi z najczęstszych zmian nowotworowych w organizmie ludzkim, ze szczególnym nasileniem występowania w tylnym dole czaszki [Stevenson 2004, Young 2000]. Ze względu na częstą infiltrację komórek guza w głąb tkanek zdrowych, szczególnie w przypadku nowotworów złośliwych, brak jest wyraźnej granicy precyzyjnie definiującej obszar nowotworu, co w przypadku jego sąsiedowania z ważnymi strukturami mózgu w znacznym stopniu ogranicza możliwość wykonania biopsji i zabiegów chirurgicznych. Ponieważ prawidłowe zaklasyfikowanie typu guza oraz ocena stopnia złośliwości pełnią kluczową rolę w wyborze procesu leczenia, dlatego istotnym problemem jest udoskonalenie i zwiększenie skuteczności nieinwazyjnych metod diagnostycznych. Rola tych metod staje się szczególnie ważna w aspekcie braku stuprocentowej pewności wyniku badania histopatologicznego materiału uzyskanego drogą biopsji [Heper 2005, Samadani 2006] oraz wobec niejednoznaczności badań obrazowych, w których zmiany demielinizacyjne często imitują postać nowotworu [Hayashi 2003, Selviaridis 2007].

Ponadto, dzięki nieinwazyjnym metodom monitorowania procesu leczenia możliwa jest obserwacja reakcji guza (lub łoża pooperacyjnej) na leczenie, jak i wczesna detekcja progresji, wznowy oraz przerzutów do lub z innych lokalizacji [Dowling 2001, Fan 2004, Matulewicz 2006, Tarnawski 2002].

Równie istotnym elementem jest monitorowanie wpływu leczenia na zdrową tkankę [Waldrop 1998, Walecki 1999], ponieważ to właśnie stopień jej uszkodzenia jest podstawowym czynnikiem ograniczającym zakres zastosowanej terapii. Jednakże dla diagnostycznych metod obrazowych nadal istotną trudnością jest rozróżnienie np. wznowy nowotworu od martwicy spowodowanej radioterapią (RT) [Mullins 2005].

Analiza spektroskopowych profili metabolicznych tkanek nowotworowych oraz tkanki zdrowej poddanej działaniu radio- i/lub chemioterapii (CHT) pozwala nie tylko na klasyfikację nowotworów, ale również otwiera potencjalne możliwości wglądu w metabolizm procesów patologicznych skojarzonych z tworzeniem się komórek nowotworowych oraz określenie skutków ubocznych leczenia.

7.1 Materiały i metody

7.1.1 Dane spektroskopowe

Zestaw danych poddanych analizie wielowymiarowej zawierał 176 widm *in vivo* ^1H MRS pochodzących od 31 pacjentów monitorowanych po leczeniu nowotworów tylnego dołu czaszki w Centrum Onkologii – Instytucie im. Marii Skłodowskiej-Curie w Gliwicach. Mediana wieku pacjentów wynosiła 12 lat a przedział wieku 5 – 25 lat.

U 28 pacjentów (145 widm) dokonano całkowitej lub częściowej resekcji guza i na podstawie badań histopatologicznych uzyskanej tą drogą tkanki neoplastycznej, wyróżniono następujące typy nowotworów:

- medulloblastoma (IV stopień złośliwości, G-IV), MD (15 pacjentów – 74 widma),
- astrocytoma (II stopień złośliwości, G-II), ASTR (6 pacjentów – 40 widm),
- hemangioblastoma (I stopień złośliwości, G-I), HM (3 pacjentów – 15 widm),
- glioblastoma (IV stopień złośliwości, G-IV), GBM (2 pacjentów – 10 widm),
- ependymoma (II stopień złośliwości, G-II), EP (3 pacjentów – 6 widm),

U 17 pacjentów (84 widma) były to nowotwory o wysokim (G-IV) stopniu złośliwości. Stopień złośliwości nowotworu został określony na podstawie badania histopatologicznego według klasyfikacji WHO (ang. *World Health Organisation*), opartej na czterestopniowej skali (G-I – G-IV) od nowotworów najmniej złośliwych (o dużym stopniu zróżnicowania) do najbardziej złośliwych (o bardzo niskim stopniu zróżnicowania). Resekcja nie była wykonywana w przypadku guzów pnia mózgu (3 pacjentów – 31 widm).

Wszyscy pacjenci zostali napromienieni dawką całkowitą 50 lub 60 Gy, dawka frakcyjna wynosiła 1,5, 1,8 albo 2 Gy, przy czym różnice te wynikają z rodzaju i umiejscowienia guza. Charakterystyka zastosowanych technik radioterapii znajduje się w tabeli 7.1. Chemioterapia, jako leczenie uzupełniające, została zastosowana u 16 pacjentów (115 widm).

Badania kontrolne MRS/MRI rozpoczęto po zakończeniu radio- i chemioterapii – liczbę widm zarejestrowanych w skali czasu (w dniach od zakończenia radioterapii) przedstawia rysunek 7.1. Na podstawie badań kontrolnych pacjenci zostali podzieleni na następujące grupy:

- brak widocznych cech guza, BCG (17 pacjentów – 99 widm) – całkowita remisja nowotworu,

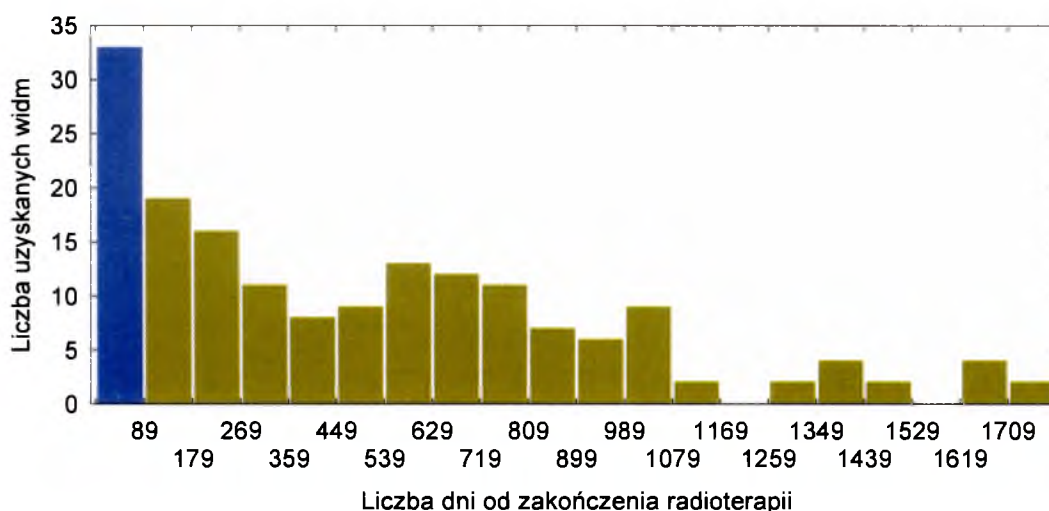
- stagnacja (5 pacjentów – 43 widma) – widoczny guz, o stałej w czasie objętości lub o objętości zmniejszonej o mniej niż 50%,
- wznowa (5 pacjentów – 26 widm) – ponowne ujawnienie się ogniska nowotworu po okresie całkowitej remisji,
- progresja (2 pacjentów – 4 widma) – wzrost objętości guza o ponad 25% lub pojawienie się nowych ognisk nowotworu.

Dwóch pacjentów (4 widma) nie zgłosiło się do kolejnych badań kontrolnych.

Tabela 7.1. Zestawienie dawek pochłoniętych dla badanej grupy pacjentów.

Typ nowotworu	Dzieci	Dorośli
MD	- cały mózg 36 Gy - dawka uzupełniająca na tylną jamę czaszki/łożę guza do 54 Gy.	- 54 – 60 Gy na guz z marginesem
ASTR	- 54 Gy na guz	- 54 – 60 Gy na guz z marginesem
HM	-	50 Gy na guz z marginesem
GBM	-	-54 – 60 Gy na guz z marginesem
EP	- cały mózg 36 Gy - dawka uzupełniająca na tylną jamę czaszki / łożę guza do 54 Gy.	- 54 – 60 Gy na guz z marginesem
Guzy pnia mózgu	- 54 Gy na guz z marginesem	- 54 Gy na guz z marginesem

MD – medulloblastoma, ASTR – astrocytoma, HM – hemangioblastoma, GBM – glioblastoma, EP – ependymoma.



Rysunek 7.1. Histogram przedstawiający liczbę widm uzyskanych w danym przedziale czasu od zakończenia radioterapii. Słupek w kolorze niebieskim przedstawia liczbę widm uzyskanych w czasie poniżej 90 dni od zakończenia radioterapii.

7.1.2 Protokół MRS

Rejestracja widm ^1H MRS *in vivo* towarzyszyła kontrolnym badaniom obrazowym wykonywanym na klinicznym tomografie MR Elscint Prestige 2 T o częstotliwości rezonansowej protonów 81,3 MHz. We wszystkich przypadkach wykorzystano sekwencję PRESS (parametry: TE = 35 ms, TR = 1500 ms oraz 50 powtórzeń), a wy tłumienie sygnału wody osiągnięto techniką CHESS.

Obszary zainteresowania (woksele) o wymiarach $1.5 \times 1.5 \times 1.5 \text{ cm}^3$ były zlokalizowane w mózdku na granicy guza lub łoża pooperacyjnej i tkanki zdrowej (GR) oraz w tkance zdrowej, oddległej od miejsca zmiany nowotworowej (REF).

Mózek jest stosunkowo niewielkim organem, o wymiarach (mierzonych od najdalszych punktów i uśrednionych ze względu na płeć, wiek (20 – 60 lat) i rozmiary czaszki) odpowiednio: 14,3 cm w kierunku poprzecznym, 6,5 cm w kierunku podłużnym i 4 cm w kierunku prostopadłym [Solov'ev 2006]. Półkule mózku mają mocno spłaszczony kształt, przez co objętość organu jest znacznie mniejsza i wynosi około 130 cm^3 [Kułak 2007, Luft 1999]. Półkule mózku to głównie gęsto pofałdowana kora zbudowana z istoty szarej oraz stosunkowo niewielka ilość istoty białej.

Po wykonaniu transformaty Fouriera oraz ręcznej korekcji fazy zerowego (oraz w razie potrzeby pierwszego) rzędu powierzchnie pod krzywą wszystkich widm zostały znormalizowane do wartości 1 (100%) z wykorzystaniem oprogramowania PeakFit 4.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). W ostatnim kroku obróbki widma zostały wycelowane względem sygnału kreatyny i fosfokreatyny, tCr (3,03 ppm).

Rozdzielczość widm, w przedziale 0 – 4,2 ppm, wynosiła 1024 punkty spektralne, to oznacza, że na jeden punkt spektralny przypada wartość 0,0041 ppm. Posługując się wartością parametru VIP (parametr istotności zmiennej wejściowej, opisany w podrozdziale 5.2.4) możliwe jest określenie istotnych zakresów ppm co do jednego punktu spektralnego. W powyższej pracy, dla wygody czytelnika, wartości istotnych zakresów ppm zostały zaokrąglone do drugiego miejsca po przecinku, co w przybliżeniu odpowiada odległości równej 2,5 punktu spektralnego.

7.1.3 Analizy wielowymiarowe

Ze względu na brak istotnych sygnałów rezonansowych w obszarze bliskim 0 ppm oraz możliwość występowania pozostałości sygnału wody przy 4.2 ppm, na potrzeby analiz wielowymiarowych zakres spektralny został dodatkowo ograniczony do przedziału

0,2 – 4,0 ppm złożonego z 928 punktów spektralnych. W ten sposób ze wszystkich dostępnych widm zbudowana została macierz danych X_0 o wymiarach 176×928 .

Dodatkowo, dla potrzeb metod PLS-DA i OSC stworzono, na podstawie danych klinicznych, odpowiednie macierze klas Y , będące podstawą do rozróżnienia widm i otrzymania profili metabolicznych charakterystycznych dla:

- danych grup histopatologicznych,
- grup wyznaczonych na podstawie badań kontrolnych,
- wczesnych i późnych powikłań po radioterapii (jako granicę pomiędzy obiema grupami przyjęto okres 90 dni – zgodnie z założeniami zaproponowanymi przez Grupę RTOG (ang. *Radiation Therapy and Oncology Group*),
- odpowiedzi tkanki mózgu na przeprowadzoną resekcję guza,
- odpowiedzi tkanki mózgu na zastosowanie chemioterapii,
- stopnia złośliwości nowotworu.

Ponadto dokonano porównania otrzymanych wyników dla lokalizacji bliskiej (granica guza/łoży i tkanki zdrowej, GR) i odległej (obszar referencyjny, REF) od zmiany nowotworowej.

Podczas filtrowania OSC zestaw danych był sprawdzany (metodą PCA) na obecność przypadków odstających każdorazowo po usunięciu kolejnego komponentu OSC, żaden z przypadków nie został zaklasyfikowany do usunięcia.

Analizy wielowymiarowe zostały wykonane z wykorzystaniem oprogramowania SIMCA-P+ (Umetrics AB, Umeå, Szwecja) oraz STATISTICA 7.1 (Statsoft Inc., Tulsa, USA).

Z racji tego, że analizom poddawane są całe widma 1H MRS, termin „stężenie” używany do interpretacji wyników tych analiz należy rozumieć jako znormalizowaną powierzchnię pod pikiem danego sygnału w widmie.

Do dodatkowej weryfikacji oceny grupowania widm na wykresach współrzędnych czynnikowych przypadków wykorzystano klasyczne metody statystyczne, za pomocą których sprawdzono czy współrzędne czynnikowe przypadków różnią się istotnie pomiędzy danymi grupami. Dla problemów dwuklasowych zastosowano test U Manna-Whitneya (U M-W) lub test t-Studenta, natomiast dla problemów wieloklasowych test Kruskala-Wallisa (K-W). Wybór testu statystycznego poprzedzono sprawdzeniem normalności rozkładu (testu Shapiro-Wilka) oraz jednorodności wariancji (test Levene'a).

7.1.4 Klasyfikacja metodą sieci neuronowych

Przygotowanie danych wejściowych do uczenia sieci neuronowych przebiegało dwuetapowo. W pierwszym etapie wybrano zbiór uczący i zewnętrzny zbiór testowy, a następnie przeprowadzono redukcję liczby zmiennych wejściowych.

Zewnętrzny zbiór testowy został wyodrębniony z analizowanego zestawu danych tak, aby odpowiadał około 15% liczebności zbioru uczącego. Zbiór danych uczących został podzielony na wewnętrzne podzbiory: uczący, walidacyjny i testowy, w taki sposób, aby podzbiory walidacyjny i testowy stanowiły odpowiednio 18 i 15% przypadków podzbioru uczącego. Przypadki zostały umieszczone w poszczególnych podziorach z zachowaniem reprezentatywności dla całej populacji oraz z uwzględnieniem przynależności widm do danego pacjenta (wszystkie widma pochodzące od danego pacjenta mogły być umieszczone tylko jednym podziorze). Procentowa liczebność poszczególnych podzbiorów została dobrana tak, aby zapewnić kompromis pomiędzy optymalną wydajnością procesów uczenia i testowania sieci neuronowej.

Redukcji wymiarów danych wejściowych dokonano z wykorzystaniem dwóch metod: PCA oraz algorytmu BFS. Dobór parametrów uczenia sieci został przeprowadzony metodą prób i błędów opisaną w rozdziale 7.2.6.

7.2 Wyniki

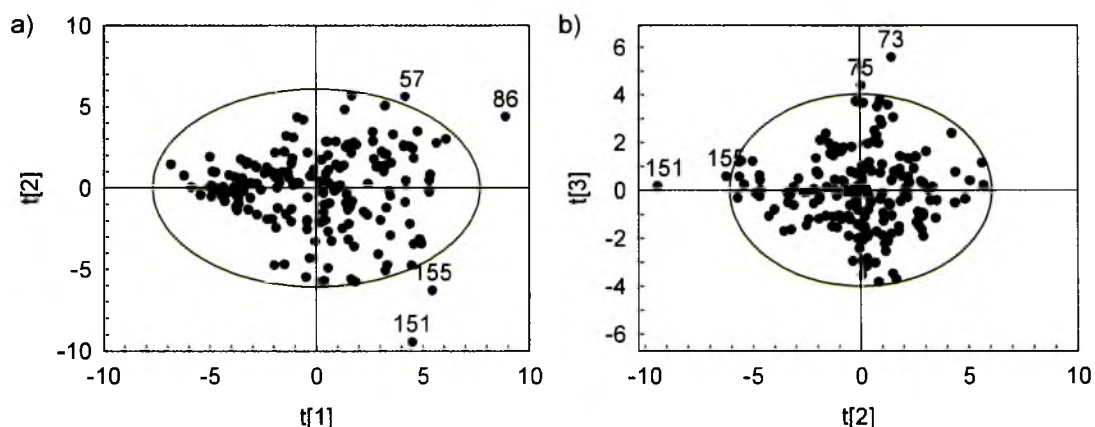
7.2.1 Detekcja odstających widm ^1H MRS i sprawdzenie rozkładu danych wejściowych metodą PCA

Po przeprowadzeniu analizy PCA na macierzy danych \mathbf{X}_0 otrzymano model złożony z dwunastu składowych głównych PC o wartościach własnych > 1 . W tabeli 7.2 przedstawiono procentowe wartości sumy kwadratów, skumulowanej sumy kwadratów danych \mathbf{X}_0 oraz wykres osypiska dla dla otrzymanego modelu. Zgodnie z wykresem osypiska, już pierwsze trzy składowe PC są wystarczające do wyjaśnienia istotnej zmienności danych \mathbf{X}_0 .

Tabela 7.2. Charakterystyka jakości modelu PCA otrzymanego z analizy macierzy \mathbf{X}_0 dla składowych PC o wartościach własnych (λ) > 1 .

PC	λ	R^2X [%]	R^2X (cum) [%]	Wykres osypiska Wartości własne macierzy kowariancji danych \mathbf{X}_0
1	67,7	38,4	38,4	
2	42,2	24	62,4	
3	18,4	10,5	72,9	
4	12	6,8	79,7	
5	9,7	5,5	85,2	
6	7,2	4,1	89,3	
7	4,3	2,4	91,7	
8	2,8	1,6	93,3	
9	1,7	1	94,3	
10	1,5	0,9	95,2	
11	1,3	0,8	96	
12	1,2	0,7	96,7	

Na podstawie wykresów współrzędnych czynnikowych przypadków dla składowych PC1, PC2 i PC3 (rysunek 7.2) wykryto 6 widm odstających, tj. widm, które znajdują się poza elipsą wyznaczającą przedział ufności 95%. Wszystkie te widma zostały sprawdzone w celu ustalenia przyczyn ich odrzucenia przez model PCA. Po wykluczeniu wpływu czynników klinicznych, jako główne przyczyny wypadania widm poza przedział ufności 95% wskazano zlokalizowanie woksela zbyt blisko kości czaszki (omyłkowo lub ze względu na poruszenie się pacjenta podczas planowania lub akwizycji spektroskopii) oraz niedostateczne wytłumienie sygnału wody. Dlatego widma te zostały wykluczone z kolejnych analiz.



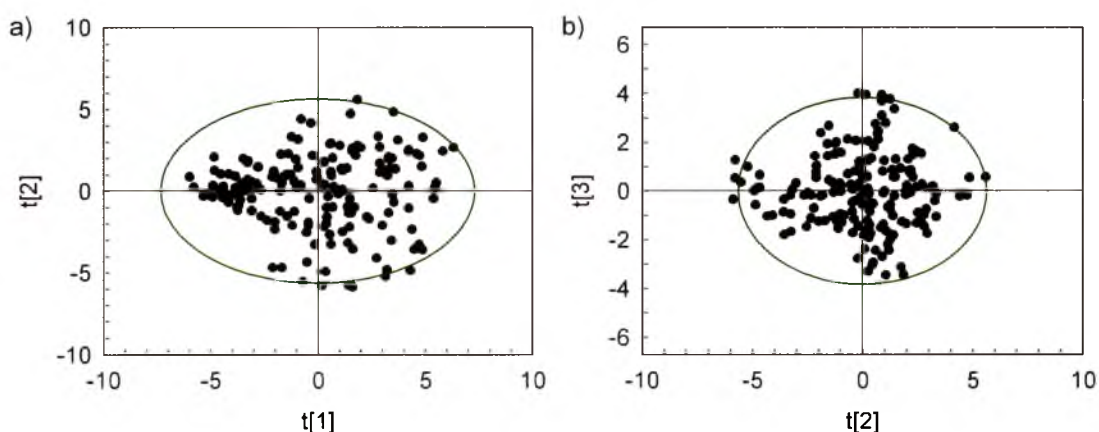
Rysunek 7.2. Wykresy współrzędnych czynnikowych przypadków dla $t1/t2$ (a) oraz $t2/t3$ (b) otrzymane z analizy PCA macierzy X_0 . Widma odstające oznaczono kolorem niebieskim.

Po ich usunięciu z danych wejściowych przeprowadzono analizę PCA na pomniejszonej macierzy X_0 oznaczonej w dalszej części tekstu jako X i o wymiarach 170×928 . W rezultacie otrzymano model złożony z dwunastu składowych PC o wartościach własnych > 1 . Charakterystyka jakości nowego modelu PCA jest przedstawiona w tabeli 7.3.

Tabela 7.3. Charakterystyka jakości modelu PCA otrzymanego z analizy macierzy X dla składowych PC o wartościach własnych (λ) > 1 .

PC	λ	R^2X [%]	R^2X (cum) [%]	Wykres osypiska Wartości własne macierzy kowariancji danych X
1	64,4	37,9	37,9	
2	38,2	22,5	60,4	
3	17,7	10,4	70,8	
4	13	7,6	78,4	
5	9,7	5,7	84,1	
6	7,7	4,5	88,6	
7	4,2	2,5	91,1	
8	2,9	1,7	92,8	
9	1,7	1	93,8	
10	1,6	0,9	94,7	
11	1,4	0,8	95,5	
12	1,2	0,7	96,2	

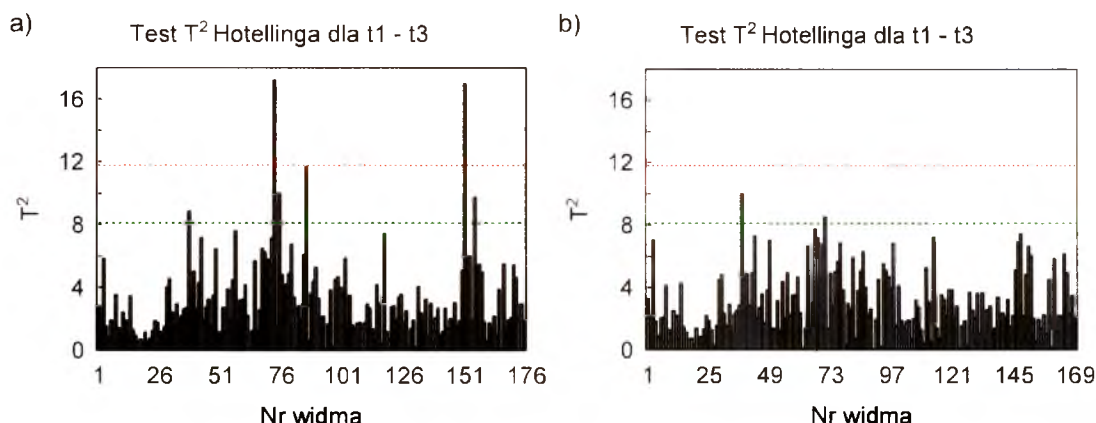
W oparciu o wykres osypiska (tabela 7.3) wybrano trzy pierwsze składowe główne, przy czym tym razem rozkład widm na wykresach współrzędnych czynnikowych przypadków (rysunek 7.3) wykazuje większy stopień jednorodności.



Rysunek 7.3. Wykresy współrzędnych czynnikowych przypadków dla $t1/t2$ (a) oraz $t2/t3$ (b) otrzymane z analizy PCA macierzy X.

Test T2 Hotellinga [Hotelling 1947] pozwala na bezpośrednie porównanie odległości każdego z widm od środka przestrzeni rozpiętej na składowych PC. Dla obu modeli takie porównanie zostało przedstawione na rysunku 7.4, z uwzględnieniem pierwszych trzech składowych PC. Dla modelu PCA otrzymanego z macierzy X_0 dwa widma znacznie wykraczają poza przedział ufności 99% (czerwona kreskowana linia), jedno leży na granicy tego przedziału, a trzy widma wykraczają poza przedział ufności 95% (zielona kreskowana linia). W teście T2 Hotellinga widma przekraczające przedział ufności 95% traktowane są jako „podejrzane”, natomiast widma będące poza przedziałem ufności 99% wymagają zdecydowanej uwagi.

Po wykluczeniu widm odstających (znalezionych na podstawie wykresów wartości czynnikowych przypadków, rysunek 7.2), jedynie dwa widma nieznacznie wykraczają poza przedział ufności 95% (rysunek 7.4b).



Rysunek 7.4. Porównanie testów T^2 Hotellinga dla modeli PCA macierzy X_0 (a) i X (b). Czerwona przerywana linia oznacza przedział ufności 99%, linia zielona oznacza przedział ufności 95%.

7.2.2 Porównanie wyników PCA z danymi klinicznymi

Na rysunku 7.5 porównano wykresy współrzędnych czynnikowych przypadków PCA dla danych zebranych w macierzy X z uwzględnieniem dostępnych informacji klinicznych.

Wzdłuż dwóch głównych kierunków największej wariancji danych X (wyjaśniających 60,4% całkowitej wariancji) jest widoczne wyraźne mieszanie się widm z poszczególnych grup wyznaczonych na podstawie informacji klinicznych. Jedynie dla grup uwzględniających rozpoznanie histopatologiczne (rysunek 7.5a), dane pochodzące z badań kontrolnych (rysunek 7.5b), dane dotyczące resekcji guza (rysunek 7.5d) oraz informacje o lokalizacji obszaru pomiarowego (rysunek 7.5g) zaznacza się niewielki trend separacji widm.

Oceny istotności statystycznej rozróżnienia widm na powyższych wykresach wartości czynnikowych przypadków względem poszczególnych kryteriów dokonano na podstawie testów K-W oraz U M-W. Tabela 7.4 przedstawia otrzymane wyniki, a wartości istotne statystycznie są oznaczone w niej kolorem czerwonym. Hipoteza zerowa – o braku istotnego rozróżnienia pomiędzy analizowanymi grupami na wykresach wartości czynnikowych przypadków – może zostać odrzucona (przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$) dla:

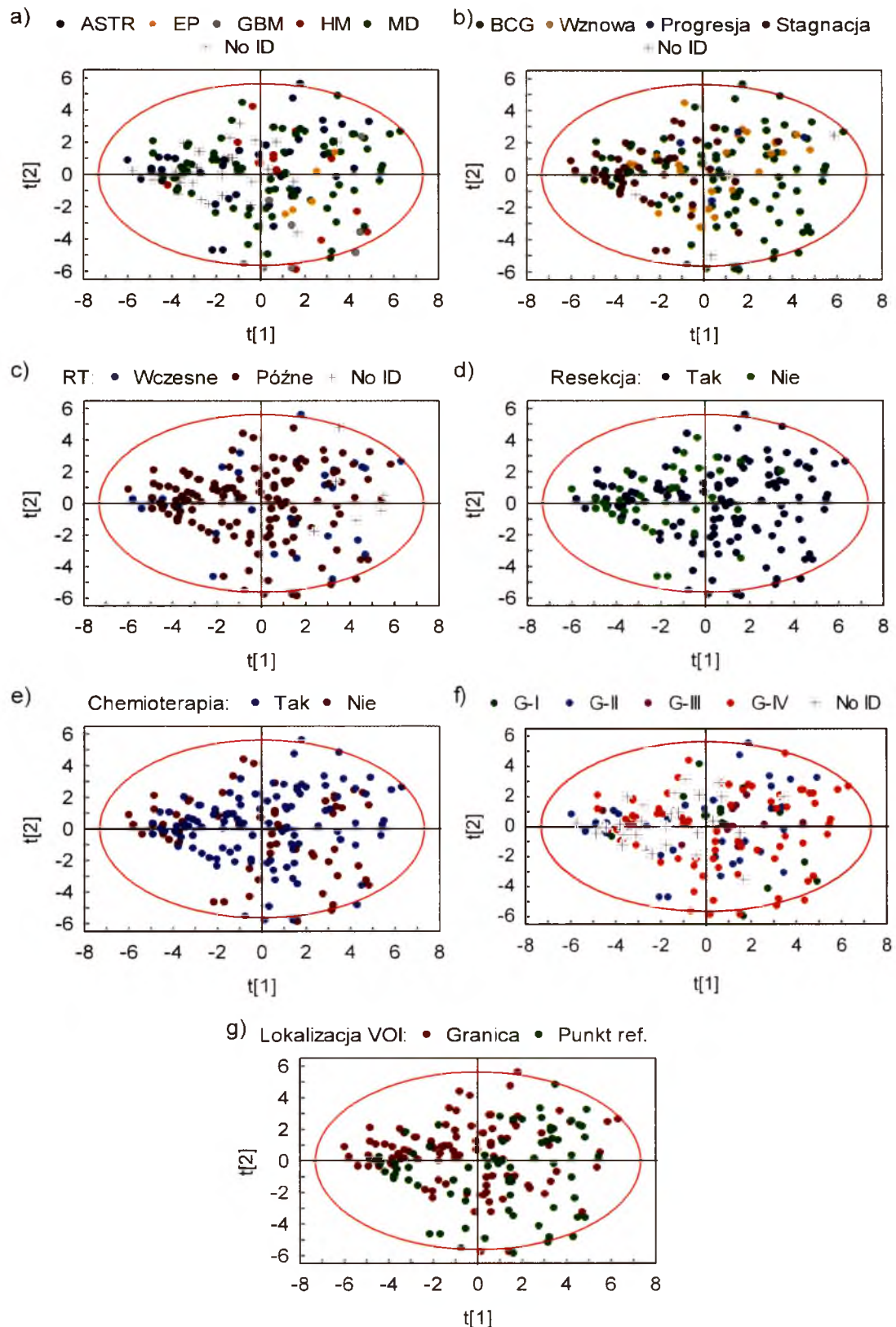
- rozróżnienia widm ze względu na przynależność do danej grupy histopatologicznej (istotne statystycznie różnice pomiędzy GBM a ASTR i MD wzdłuż drugiej składowej głównej, PC2),
- rozróżnienia widm ze względu na przynależność do danej grupy wyznaczonej na podstawie wyników badań kontrolnych (istotne statystycznie różnice pomiędzy guzem

stabilnym (Stagnacja) a brakiem cech guza (BCG) i wznową (Wznowa) nowotworu wzdłuż pierwszej składowej głównej, PC1),

- rozróżnienia widm ze względu na przeprowadzoną lub nie resekcję guza (wzdłuż pierwszej składowej głównej, PC1),
- rozróżnienia widm ze względu na lokalizację obszaru pomiarowego (dla pierwszej i drugiej składowej głównej, PC1 i PC2).

Statystyczna analiza rozkładu widm na wykresach wartości współrzędnych czynnikowych przypadków potwierdza wstępną i subiektywną interpretację wzrokową.

Na podstawie powyższych wyników można stwierdzić, że kierunki największej wariancji danych tylko w niewielkim stopniu pokrywają się z rzeczywistymi różnicami pomiędzy poszczególnymi grupami widm. Ze względu na skomplikowany charakter danych oraz mnogość dostępnych informacji klinicznych, aby uzyskać lepsze rozróżnienie poszczególnych grup widm, konieczne jest zastosowanie znacznie „silniejszych” metod analizy, które wykorzystują informację kliniczną już na etapie tworzenia modelu.



Rysunek 7.5. Porównanie rozkładów PCA danych macierzy X pogrupowanych z uwzględnieniem informacji klinicznych. Rozróżnienie grup histopatologicznych (a), stan guza/prolifracja (b), wczesne/późne zmiany popromienne (c), operacja/brak operacji (d), chemioterapia/brak chemioterapii (e), stopień złośliwości (f), lokalizacja obszaru pomiarowego (g). Oznaczenie No ID oznacza brak konkretnej informacji klinicznej.

Tabela 7.4. Wyniki testów Kruskala-Wallisa oraz U Manna-Whitneya dla rozkładów wartości współrzędnych czynnikowych przypadków otrzymanych w analizie PCA.

Ocena istotności statystycznej rozróżnienia widm ze względu na przynależność do danej grupy histopatologicznej											
PC1						PC2					
Test K-W: $H_4 = 9,331$, $p = 0,0533$						Test K-W: $H_4 = 12,8813$, $p = 0,0119$					
	HM	ASTR	MD	EP	GBM		HM	ASTR	MD	EP	GBM
HM		0,8107	1,0000	1,0000	1,0000	HM		1,0000	1,0000	1,0000	0,1070
ASTR	0,8107		0,6355	0,3647	0,2827	ASTR	1,0000		1,0000	1,0000	0,0078
MD	1,0000	0,6355		1,0000	1,0000	MD	1,0000	1,0000		1,0000	0,0161
EP	1,0000	0,3647	1,0000		1,0000	EP	1,0000	1,0000	1,0000		1,0000
GBM	1,0000	0,2827	1,0000	1,0000		GBM	0,1070	0,0078	0,0161	1,0000	
HM = hemangioblastoma, ASTR = astrocytoma, MD = medulloblastoma, EP = ependymoma, GBM = glioblastoma											
Ocena istotności statystycznej rozróżnienia widm ze względu na przynależność do danej grupy wyznaczonej na podstawie badań kontrolnych											
PC1						PC2					
Test K-W: $H_3 = 33,9653$, $p = 0,0000$						Test K-W: $H_3 = 4,0548$, $p = 0,2556$					
	BCG	Progr.	Stagn.	Wzno.		BCG	Progr.	Stagn.	Wzno.		
BCG		1,0000	0,0000	1,0000	BCG		0,7966	1,0000	0,8495		
Progr.	1,0000		0,0977	1,0000	Progr.	0,7966		1,0000	1,0000		
Stagn.	0,0000	0,0977		0,0001	Stagn.	1,0000	1,0000		1,0000		
Wzno.	1,0000	1,0000	0,0001		Wzno.	0,8495	1,0000	1,0000			
BCG = brak cech guza, Progr. = progresja, Stagn. = guz stabilny, Wzno. = wznowa											
Ocena istotności statystycznej rozróżnienia widm ze względu na wczesne i późne zmiany popromienne											
PC1						PC2					
Test U M-W: $Z = 1,2165$, $p = 0,2238$						Test U M-W: $Z = 1,2274$, $p = 0,2197$					
Ocena istotności statystycznej rozróżnienia widm ze względu na przeprowadzoną lub nie resekcję guza											
PC1						PC2					
Test U M-W: $Z = 4,7087$, $p = 0,0000$						Test U M-W: $Z = -0,6689$, $p = 0,5035$					
Ocena istotności statystycznej rozróżnienia widm ze względu na zastosowanie lub nie leczenia chemioterapią											
PC1						PC2					
Test U M-W: $Z = 0,3684$, $p = 0,7125$						Test U M-W: $Z = -1,2717$, $p = 0,2035$					
Ocena istotności statystycznej rozróżnienia widm ze względu na stopień złośliwości nowotworu											
PC1						PC2					
Test K-W: $H_3 = 2,8155$, $p = 0,4210$						Test K-W: $H_3 = 0,4616$, $p = 0,9272$					
	G-I	G-II	G-III	G-IV		G-I	G-II	G-III	G-IV		
G-I		1,0000	1,0000	1,0000	G-I		1,0000	1,0000	1,0000		
G-II	1,0000		1,0000	0,8520	G-II	1,0000		1,0000	1,0000		
G-III	1,0000	1,0000		1,0000	G-III	1,0000	1,0000		1,0000		
G-IV	1,0000	0,8520	1,0000		G-IV	1,0000	1,0000	1,0000			
Ocena istotności statystycznej rozróżnienia widm ze względu na lokalizację obszaru pomiarowego											
PC1						PC2					
Test U M-W: $Z = 3,5467$, $p = 0,0004$						Test U M-W: $Z = -2,6273$, $p = 0,0086$					

H_n – wartość statystyki testu K-W przybliżona rozkładem χ^2 , n – liczba stopni swobody.

Z – wartości statystyki testu U M-W przybliżona rozkładem normalnym.

7.2.3 Dyskusja

PCA jest jedną z wielu popularnych metod detekcji przypadków odstających w wielowymiarowych zestawach danych [Underwood 2006, Kekkonen 2008, Kochhar 2006, Rousseau 2008]. Problem identyfikacji przypadków znacznie różniących się od pozostałych stanowi przedmiot intensywnych badań, ponieważ w określonych sytuacjach, przypadki te mogą dostarczać istotnych informacji. Zastosowanie algorytmów detekcji przypadków odstających pozwala między innymi na wykrywanie oszustw finansowych przy użyciu kart kredytowych, ataków na sieci komputerowe oraz sieci telefonii komórkowej, jak również na analizowanie przyczyn krachów giełdowych [Bolton 2002, Kumpulainen 2008, Schluter 2008, Tang 2007]. Jednakże w sytuacji, gdy celem analizy jest grupowanie przypadków oraz ujawnienie cech będących przyczyną tego grupowania, obecność przypadków odstających jest niepożądana [Robertson 2005, Thanasoulas 2003]. Niewątpliwie jednak odstające widma MRS niosą istotną informację: pozwalają zidentyfikować przypadki znacząco odbiegające klinicznie lub jakościowo. Wprawdzie wykorzystywana do grupowania widm metoda PLS-DA jest bardziej odporna na braki oraz błędy w danych niż metody liniowe (np. LDA), to homogeniczność danych wejściowych umożliwia osiągnięcie dokładniejszych rezultatów. Silnie negatywny wpływ widm odstających jest szczególnie widoczny w przypadku techniki OSC [Wold 1998].

Zidentyfikowane za pomocą PCA (rysunek 7.2) widma odstające zostały sprawdzone pod kątem czynników powodujących ich oddzielenie (co miało zapobiec usunięciu przypadków zawierających istotną informację kliniczną), a następnie wykluczone z kolejnych analiz.

Otrzymany nowy rozkład widm (rysunek 7.3) ujawnił kilka kolejnych przypadków poza elipsą wyznaczającą przedział ufności 95%, jednak jedynie dwa z nich znajdują się poza tym przedziałem w teście T^2 Hotellinga dla trzech pierwszych składowych PC. W zaistniałej sytuacji, kiedy brak jest widm wyraźnie odstających, decyzja o usuwaniu kolejnych widm jest subiektywna. Ponieważ wszystkie widma zdają się tworzyć w miarę jednolitą chmurę (rysunek 7.3), dlatego też wydaje się słuszne poprzestanie na usunięciu jedynie sześciu widm zidentyfikowanych podczas pierwszej analizy PCA.

Porównanie rozkładów widm (zgrupowanych z uwzględnieniem dostępnych danych klinicznych) na wykresach wartości czynnikowych dla dwóch pierwszych składowych głównych (rysunek 7.5) wykazało jedynie słabe zależności. Wynika to z właściwości metody PCA, której głównym zadaniem jest reprezentacja danych w zredukowanym i odzwierciedlającym największą wariancję danych układzie współrzędnych [Lavine

2000], a nie grupowanie widm i ujawnianie cech odpowiedzialnych za tworzenie danych grup. Separacja grup metodą PCA jest możliwa jedynie w sytuacji, kiedy różnice pomiędzy grupami pokrywają się z kierunkami największej wariancji, jednakże w wielowymiarowych i skomplikowanych zestawach danych sytuacja ta zdarza się stosunkowo rzadko. Analizowany zestaw danych charakteryzuje się wysokim stopniem złożoności, różnorodnością nakładających się procesów metabolicznych oraz występującą zmiennością osobniczą, dlatego metoda bez nauczyciela, jaką jest PCA nie może poradzić sobie ze skutecznym rozpoznaniem poszczególnych grup.

7.2.4 Analiza i grupowanie widm ^1H MRS metodą PLS-DA oraz PLS-DA z filtrowaniem OSC

Na potrzeby PLS-DA i OSC zbudowano – w oparciu o informacje kliniczne – sześć macierzy \mathbf{Y} opisujących przyporządkowanie widm do poszczególnych klas. Pacjenci, u których stwierdzono brak niektórych danych klinicznych (np. brak badania histopatologicznego lub badań kontrolnych), zostali wykluczeni z odpowiednich analiz. Szczegółowe zestawienie macierzy danych poddawanych analizom znajduje się w tabeli 7.5.

Tabela 7.5. Liczby widm i klas uwzględnianych w danej analizie PLS-DA.

Rodzaj analizy	Liczba widm	Liczba klas	Macierz danych
Typ guza	139	5	\mathbf{X}_1 (139×928)
Badania kontrolne	166	4	\mathbf{X}_2 (166×928)
Powikłania po RT	164	2	\mathbf{X}_3 (164×928)
Resekcja guza	170	2	\mathbf{X} (170×928)
Chemioterapia	170	2	\mathbf{X} (170×928)
Stopień złośliwości guza	139	4	\mathbf{X}_1 (139×928)

7.2.4.1 Rozróżnienie widm ^1H MRS ze względu na przynależność do danej grupy histopatologicznej

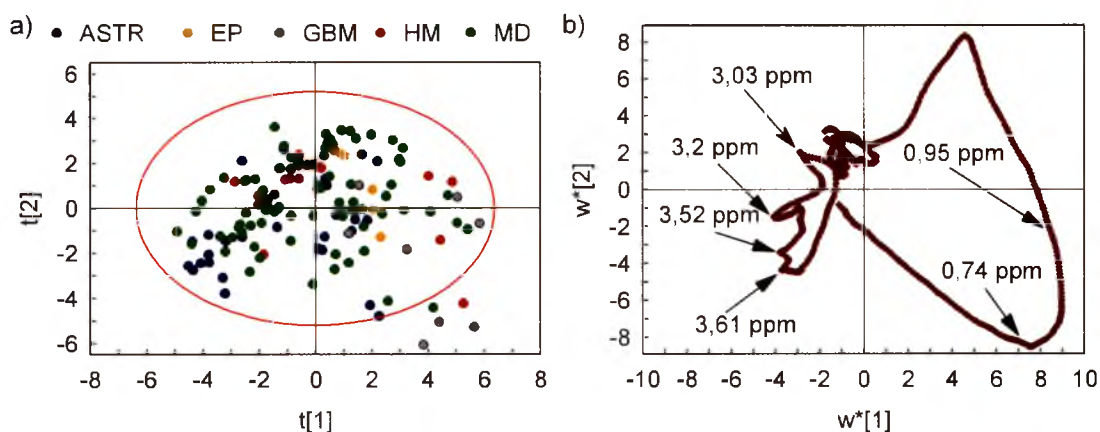
Jako wynik analizy PLS-DA przeprowadzonej pod kątem rozróżnienia typów guza oraz identyfikacji profili metabolicznych charakterystycznych dla danego typu guza otrzymano model (PLS-DA-1) złożony z dwóch istotnych składowych ukrytych (za próg istotności przyjęto $Q^2 > 0$, zgodnie z wytycznymi opisanymi w podrozdziale 5.2.3), którego charakterystyka jest przedstawiona w tabeli 7.6.

W tabelach prezentujących charakterystyki modeli oraz etapy filtrowania OSC (tabele 7.6-7.10, 7.12-7.14, 7.16, 7.17, 7.19-7.21, 7.23, 7.24, 7.26-7.28) kolorem niebieskim oznaczono wartość danego parametru, która nie przekroczyła progu istotności – dotyczy to parametrów Q^2 oraz $R^2\text{OSC}$.

Tabela 7.6. Charakterystyka jakości modelu PLS-DA-1.

LC	λ	$R^2\mathbf{X}$ [%]	$R^2\mathbf{X}$ (cum) [%]	$R^2\mathbf{Y}$ [%]	$R^2\mathbf{Y}$ (cum) [%]	Q^2 [%]	Q^2 (cum) [%]
1	41,8	30,1	30,1	4,8	4,8	3,3	3,3
2	36,9	26,6	56,7	2,6	7,4	0,7	4
3	13,5	9,7	66,4	2,9	10,3	-0,3	3,7

Pomimo wyraźnego mieszania się widm pochodzących z poszczególnych grup, porównanie wykresów współrzędnych czynnikowych przypadków oraz wag (rysunek 7.6) pozwala wnioskować o silnie podwyższonych sygnałach lipidowych (0,74 – 0,95 ppm) w grupie GBM (glioblastoma), której widma w większości znajdują się w IV ćwiartce wykresu. W słabym stopniu widoczne jest również rozróżnienie grupy ASTR (astrocytoma) względem pierwszej składowej ukrytej LC1.



Rysunek 7.6. Wykresy współrzędnych czynnikowych przypadków (a) oraz wag (b) modelu PLS-DA-1.

Po wykluczeniu grup ASTR (astrocytoma) i GBM (glioblastoma) utworzono model PLS-DA-2, jednakże żadna ze składowych ukrytych tego modelu nie przekroczyła progu istotności.

W kolejnym kroku dane zostały poddane filtrowaniu OSC. Tabela 7.7 przedstawia stopień ortogonalności kolejnych wektorów t^{osc} względem macierzy Y oraz wartości R^2 dla obliczonych komponentów OSC (R^2_{OSC}). Charakterystykę modelu PLS-DA otrzymanego po wstępnym filtrowaniu OSC (OSC PLS-DA-1) przedstawia tabela 7.8.

Tabela 7.7. Usuwanie z modelu PLS-DA-1 informacji niezwiązanej z danymi histopatologicznymi metodą filtrowania OSC.

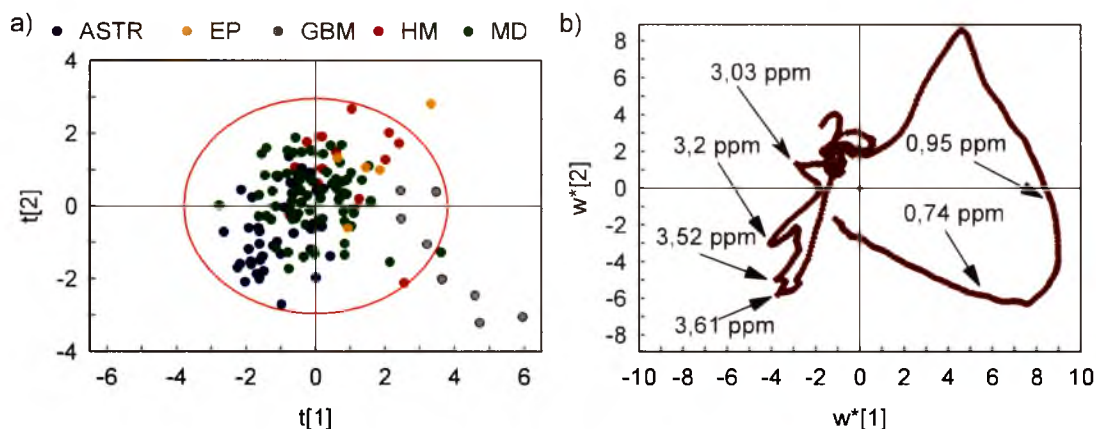
OSC	Deg. [°]	R^2_{OSC} [%]	Warunek istotności komponentu OSC
1	89,82	31,7	$R^2_{OSC} [\%] > 2/\min(m,n) \cdot 100$ $2/139 \cdot 100 = 1,4$
2	89,87	17	
3	89,86	9,1	
4	89,65	1,8	
5	89,19	0,3	

Deg. – kąt pomiędzy kolejnymi wektorami t^{osc} i macierzą Y .

Tabela 7.8. Charakterystyka jakości modelu OSC PLS-DA-1.

LC	λ	R^2X [%]	R^2X (cum) [%]	R^2Y [%]	R^2Y (cum) [%]	Q^2 [%]	Q^2 (cum) [%]
1	33,5	24,1	24,1	13,4	13,4	11,3	11,3
2	21,9	15,7	39,8	7,6	21	5,6	16,9
3	10,8	7,8	47,6	4,1	25,1	-0,8	16,1

Porównanie charakterystyk przedstawionych w tabelach 7.6 i 7.8 dowodzi skuteczności filtrowania OSC. Prawie trzykrotny wzrost wartości R^2Y (cum) oraz ponad czterokrotny wzrost wartości Q^2 (cum) wskazują na zdecydowane polepszenie jakości otrzymanego modelu. Ponadto, na wykresie współrzędnych czynnikowych przypadków (rysunek 7.7) widoczna jest wyraźna poprawa w rozróżnieniu poszczególnych grup histopatologicznych, przy czym czynnik determinujący rozróżnienie pozostał ten sam – jest to silnie podwyższony zakres spektralny pomiędzy 0,74 a 0,95 ppm w grupie GBM (glioblastoma).



Rysunek 7.7. Wykresy współrzędnych czynnikowych przypadków (a) oraz wag (b) modelu OCS PLS-DA-1.

Filtrowanie OSC poprawiło również rozróżnienie pozostałych grup histopatologicznych uwidaczniając podwyższone sygnały tCho (3,2 ppm) oraz mI (3,52 i 3,61 ppm) w astrocytynie (rysunek 7.7).

Wykluczenie grup ASTR (astrocytoma) oraz silnie odseparowanej grupy GBM (glioblastoma) daje możliwość wglądu w profile metaboliczne pozostałych analizowanych grup histopatologicznych. Po odjęciu sześciu komponentów OSC (tabela 7.9), otrzymano model OSC PLS-DA-2, którego charakterystyka została zawarta w tabeli 7.10.

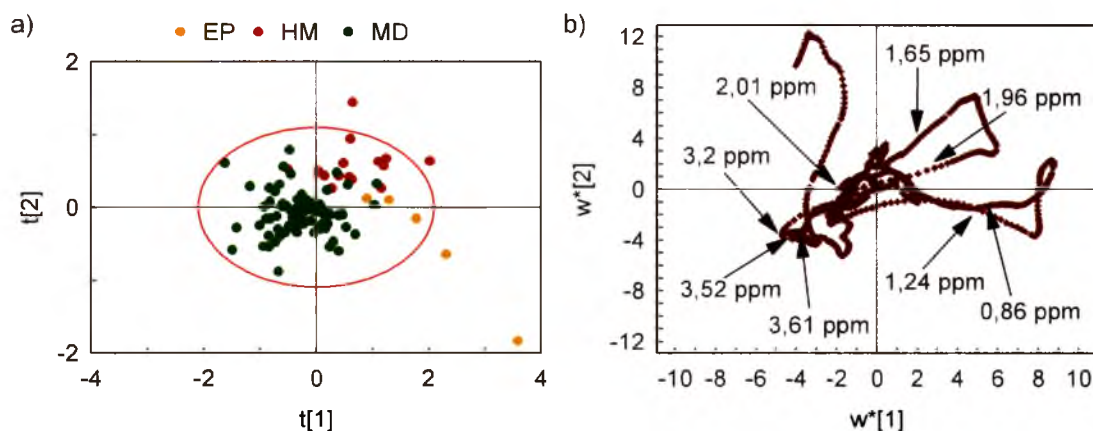
Tabela 7.9. Usuwanie z modelu PLS-DA-2 informacji niezwiązanej z danymi histopatologicznymi metodą filtrowania OSC, po wykluczeniu grup ASTR i GBM.

OSC	Deg. [°]	R ² OSC [%]	Warunek istotności komponentu OSC
1	89,95	37	$R^2\text{OSC} [\%] > 2/\min(m,n) \cdot 100$ $2/92 \cdot 100 = 2,2$
2	89,97	22,6	
3	89,96	11,4	
4	89,91	4,6	
5	89,97	4,5	
6	89,91	4,2	
7	89,83	1,7	

Deg. – kąt pomiędzy kolejnymi wektorami t^{osc} i macierzą Y.

Tabela 7.10. Charakterystyka jakości modelu OSC PLS-DA-2.

LC	λ	R ² X [%]	R ² X (cum) [%]	R ² Y [%]	R ² Y (cum) [%]	Q ² [%]	Q ² (cum) [%]
1	20,9	22,7	22,7	28,6	28,6	20	20
2	6,4	7	29,7	19	47,6	10,8	30,8
3	14,7	16	45,7	2,4	50	-4	26,8



Rysunek 7.8. Wykresy współrzędnych czynnikowych przypadków (a) oraz wag (b) modelu OCS PLS-DA-2.

Zestawienie wykresów współrzędnych czynnikowych przypadków oraz wag modelu OSC PLS-DA-2 (rysunek 7.8) pozwala stwierdzić, że czynnikami umożliwiającymi rozróżnienie grup są wyraźnie podwyższony zakres widmowy pomiędzy 0,86 i 1,24 ppm (odpowiadający sygnałom pochodzącym od Lip (0,9 ppm), kwasów tłuszczowych i makromolekuł) oraz obniżenie pozostałej części widma w grupie

EP (ependymoma). Jest to w zdecydowanej opozycji do medulloblastomy (grupa MD), gdzie największą intensywność wykazują sygnały pochodzące od głównych neurometabolitów: tCho (3,2 ppm), mI (3,52 i 3,61 ppm) oraz tCr (3,03 ppm) i NAA (2,01 ppm). Grupie HM (hemangioblastoma) można przypisać podwyższone sygnały w zakresie spektralnym 1,6 – 1,96 ppm, w którym swoje sygnały rezonansowe ma GABA i Ace. Ponadto przesunięcie widm tej grupy do pierwszej ćwiartki wykresu współrzędnych czynnikowych przypadków wskazuje na obniżone w stosunku do grupy MD sygnały tCho (3,2 ppm), mI (3,52 i 3,61 ppm) oraz tCr (3,03 ppm) i NAA (2,01 ppm). Natomiast na podstawie analizy rozkładu danych względem pierwszej składowej ukrytej (LC1) można postulować niewielki wzrost sygnałów Lip (0,9 ppm) w HM.

Tabela 7.11. Wyniki testów Kruskala-Wallisa dla rozkładów wartości współrzędnych czynnikowych przypadków otrzymanych w analizach przeprowadzonych z uwzględnieniem danych histopatologicznych.

Model PLS-DA-1											
LC1						LC2					
Test K-W: $H_4 = 25,07972$, $p = 0,0000$						Test K-W: $H_4 = 11,26335$, $p = 0,0238$					
	HM	ASTR	MD	EP	GBM		HM	ASTR	MD	EP	GBM
HM		0,6889	1,0000	1,0000	0,0589	HM		0,4344	1,0000	1,0000	0,0472
ASTR	0,6889		0,3794	0,0752	0,0000	ASTR	0,4344		1,0000	1,0000	1,0000
MD	1,0000	0,3794		0,6391	0,0030	MD	1,0000	1,0000		1,0000	0,1189
EP	1,0000	0,0752	0,6391		1,0000	EP	1,0000	1,0000	1,0000		0,3158
GBM	0,0589	0,0000	0,0030	1,0000		GBM	0,0472	1,0000	0,1189	0,3158	
Model OSC PLS-DA-1											
LC1						LC2					
Test K-W: $H_4 = 58,40134$, $p = 0,0000$						Test K-W: $H_4 = 36,92169$, $p = 0,0000$					
	HM	ASTR	MD	EP	GBM		HM	ASTR	MD	EP	GBM
HM		0,0001	1,0000	1,0000	0,1303	HM		0,0001	0,3987	1,0000	0,0010
ASTR	0,0001		0,0001	0,0002	0,0000	ASTR	0,0001		0,0006	0,0166	1,0000
MD	1,0000	0,0001		0,1614	0,0005	MD	0,3987	0,0006		1,0000	0,0272
EP	1,0000	0,0002	0,1614		1,0000	EP	1,0000	0,0166	1,0000		0,0150
GBM	0,1303	0,0000	0,0005	1,0000		GBM	0,0010	1,0000	0,0272	0,0150	
Model OSC PLS-DA-2											
LC1						LC2					
Test K-W: $H_2 = 33,24926$, $p = 0,0000$						Test K-W: $H_2 = 31,26955$, $p = 0,0000$					
	EP	HM	MD				EP	HM	MD		
EP		0,7556	0,0002			EP		0,0010	1,0000		
HM	0,7556		0,0000			HM	0,0010		0,0000		
MD	0,0002	0,0000				MD	1,0000	0,0000			

H_n – wartość statystyki testu K-W przybliżona rozkładem χ^2 , n – liczba stopni swobody.

Oceny istotności statystycznej rozróżnienia widm na wykresach wartości czynnikowych przypadków otrzymanych w analizach uwzględniających przynależność do danej grupy histopatologicznej (rysunki 7.6 a, 7.7 a i 7.8 a) dokonano na podstawie

testu K-W. Tabela 7.11 przedstawia otrzymane wyniki, a wartości istotne statystycznie są oznaczone kolorem czerwonym. Hipoteza zerowa – o braku istotnego rozróżnienia pomiędzy analizowanymi grupami na wykresach wartości czynnikowych przypadków – może zostać odrzucona (przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$) dla każdego z analizowanych wykresów.

W modelu PLS-DA-1 grupa GBM (glioblastoma) różni się istotnie od grup ASTR (astrocytoma) i MD (medulloblastoma) względem pierwszej składowej ukrytej, LC1. Istotna statystycznie różnica między GBM i HM (hemangioblastoma) występuje wzdłuż drugiej składowej ukrytej, LC2.

W modelu OSC PLS-DA-1 istotne statystycznie rozseparowanie grup jest widoczne dla astrocytomy i glioblastomy. Po wykluczeniu grup ASTR i GBM (model OSC PLS-DA-2) istotne statystycznie staje się rozróżnienie pomiędzy medulloblastomą i pozostałymi grupami – względem pierwszej składowej ukrytej, LC1, oraz pomiędzy hemangioblastomą i pozostałymi grupami dla drugiej składowej ukrytej, LC2.

7.2.4.2 Rozróżnienie widm ^1H MRS ze względu na przynależność do grupy wyznaczonej na podstawie badań kontrolnych

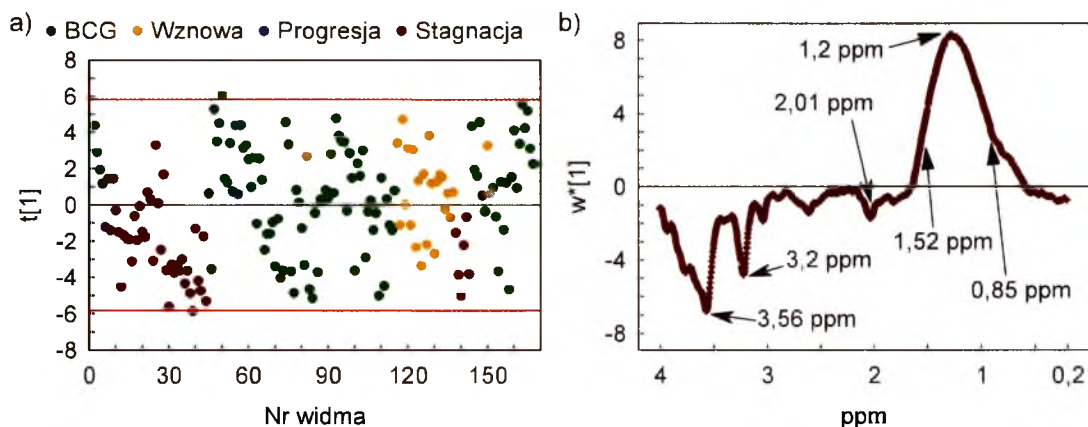
W wyniku analizy PLS-DA macierzy X_2 konstruowanej pod kątem rozróżniania grup (brak cech guza, stagnacja, progresja i wznowa) klasyfikowanych przez lekarza prowadzącego w czasie badań kontrolnych otrzymano model PLS-DA-3 złożony z jednej istotnej statystycznie składowej ukrytej LC1 (tabela 7.12).

Tabela 7.12. Charakterystyka jakości modelu PLS-DA-3.

LC	λ	R^2X [%]	R^2X (cum) [%]	R^2Y [%]	R^2Y (cum) [%]	Q^2 [%]	Q^2 (cum) [%]
1	62,8	37,8	37,8	8,3	8,3	7	7
2	36,6	22,1	59,9	1	9,3	-2,4	4,6

Na podstawie wykresu współrzędnych czynnikowych przypadków nie jest możliwe rozróżnienie analizowanych grup, a tym samym na wskazanie charakterystycznych dla nich profili metabolicznych (rysunek 7.9).

Podczas filtrowania OSC odjęto cztery komponenty OSC (tabela 7.13), a następnie w wyniku analizy PLS-DA otrzymano model OSC PLS-DA-3 złożony z dwóch istotnych statystycznie składowych ukrytych LC1 i LC2 (tabela 7.14).



Rysunek 7.9. Wykresy współrzędnych czynnikowych przypadków (a) oraz wag (b) modelu PLS-DA-3.

Tabela 7.13. Usuwanie z modelu PLS-DA-3 informacji niezwiązanej z wynikami badań kontrolnych.

OSC	Deg. [°]	R ² OSC [%]	Warunek istotności komponentu OSC
1	89,86	25,7	$R^2\text{OSC} [\%] > 2/\min(m,n) \cdot 100$ $2/166 \cdot 100 = 1,2$
2	89,72	20,4	
3	89,76	4,5	
4	89,80	2,5	
5	89,60	0,4	

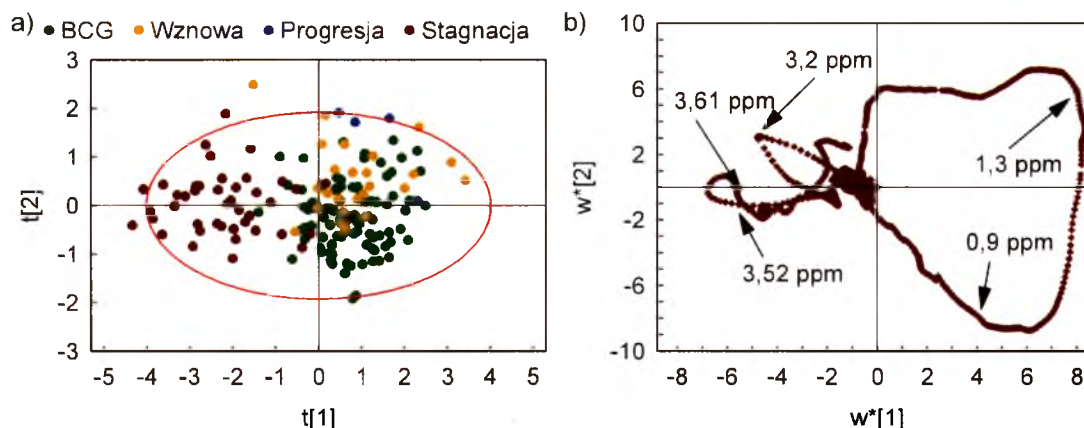
Deg. – kąt pomiędzy kolejnymi wektorami t_{osc} i macierzą Y .

Tabela 7.14. Charakterystyka jakości modelu OSC PLS-DA-3.

LC	λ	R ² X [%]	R ² X (cum) [%]	R ² Y [%]	R ² Y (cum) [%]	Q ² [%]	Q ² (cum) [%]
1	41	24,7	24,7	25,6	25,6	24,5	24,5
2	11,6	7	31,7	7,1	32,7	1,6	26,1
3	21,7	13	44,7	1,2	33,9	-4,5	21,6

Także w tym przypadku filtrowanie OSC prowadzi do wzrostu wartości parametrów R^2Y oraz Q^2 , co przekłada się na wyraźną poprawę jakości grupowania widm na wykresie współrzędnych czynnikowych przypadków (rysunek 7.10a). Pierwsza składowa ukryta wskazuje na wyraźny wzrost sygnałów pomiędzy 0,89 a 1,52 ppm oraz obniżenie stężeń $t\text{Cho}$ (3,2 ppm) i mI (3,52 i 3,61 ppm) w grupach wznowy, progresji oraz braku cech guza (BCG), co jest w opozycji do cech obserwowanych dla grupy stagnacji nowotworu (rysunek 7.10). Druga składowa ukryta, LC2, pozwala na rozróżnienie grup braku cech guza (BCG) od wznowy i progresji. Widma z grupy braku cech guza (BCG) leżą

w większości w obszarze ujemnych wartości LC2, gdzie widoczny jest wzrost sygnałów Lip przy 0,9 ppm. Natomiast wzrost sygnałów Lip i/lub Lac przy 1,3 ppm charakteryzuje grupy wznowy i progresji, zajmujące obszar, w którym wartości drugiej składowej ukrytej, LC2, są dodatnie (rysunek 7.10).



Rysunek 7.10. Wykresy współrzędnych czynnikowych przypadków (a) oraz wag (b) modelu OSC PLS-DA-3.

Oceny istotności statystycznej rozróżnienia widm na wykresach wartości czynnikowych przypadków ze względu na przynależność do danej grupy wyznaczonej na podstawie badań kontrolnych (rysunki 7.9 a i 7.10 a) dokonano na podstawie testu K-W. Tabela 7.15 przedstawia otrzymane wyniki, a wartości istotne statystycznie są oznaczone kolorem czerwonym. Hipoteza zerowa – o braku istotnego rozróżnienia pomiędzy analizowanymi grupami na wykresach wartości czynnikowych przypadków – może zostać odrzucona (przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$) dla każdego z analizowanych wykresów.

W modelu PLS-DA-3 istotne statystycznie różnice są obserwowane pomiędzy grupami stagnacji (guz stabilny) i wznowy nowotworu oraz grupą BCG (brak cech guza). Po filtrowaniu OSC (model OSC PLS-DA-3), rozróżnienie pomiędzy guzem stabilnym a pozostałymi grupami jest istotne statystycznie względem pierwszej składowej ukrytej, LC1, natomiast dla drugiej składowej ukrytej, LC2, istotne statystycznie różnice są widoczne pomiędzy grupą BCG a grupami progresji i wznowy.

Tabela 7.15. Wyniki testów Kruskala-Wallisa dla rozkładów wartości współrzędnych czynnikowych przypadków otrzymanych w analizach bazy widm zarejestrowanych badań kontrolnych.

Model PLS-DA-3				
1 LC				
Test K-W: $H_3 = 37,42413$, $p = 0,0000$				
	BCG	Progresja	Stagnacja	Wznowa
BCG		1,0000	0,0000	1,0000
Progresja	1,0000		0,0989	1,0000
Stagnacja	0,0000	0,0989		0,0000
Wznowa	1,0000	1,0000	0,0000	

Model OSC PLS-DA-3									
1 LC					2 LC				
Test K-W: $H_3 = 91,53337$, $p = 0,0000$					Test K-W: $H_3 = 26,64163$, $p = 0,0000$				
	BCG	Progresja	Stagnacja	Wznowa		BCG	Progresja	Stagnacja	Wznowa
BCG		1,0000	0,0000	1,0000	BCG		0,0117	0,2567	0,0001
Progresja	1,0000		0,0002	1,0000	Progresja	0,0117		0,1243	1,0000
Stagnacja	0,0000	0,0002		0,0000	Stagnacja	0,2567	0,1243		0,0987
Wznowa	1,0000	1,0000	0,0000		Wznowa	0,0001	1,0000	0,0987	

H_n – wartość statystyki testu K-W przybliżona rozkładem χ^2 , n – liczba stopni swobody.

7.2.4.3 Rozróżnienie wczesnych i późnych powikłań po radioterapii na podstawie analizy widm ^1H MRS

Analiza PLS-DA macierzy X_3 prowadzona pod kątem znalezienia różnic w profilach metabolicznych charakterystycznych dla wczesnych i późnych powikłań po radioterapii nie dostarczyła składowych ukrytych osiągających próg istotności. Dopiero po przeprowadzeniu filtrowania OSC (tabela 7.16) otrzymano model PLS-DA złożony z jednej istotnej składowej ukrytej, LC1. Parametry jakościowe tego modelu – został on oznaczony jako OSC PLS-DA-4 – są zaprezentowane w tabeli 7.17.

Tabela 7.16. Usuwanie z modelu PLS-DA-4 informacji niezwiązanej z odpowiedzią metaboliczną na radioterapię.

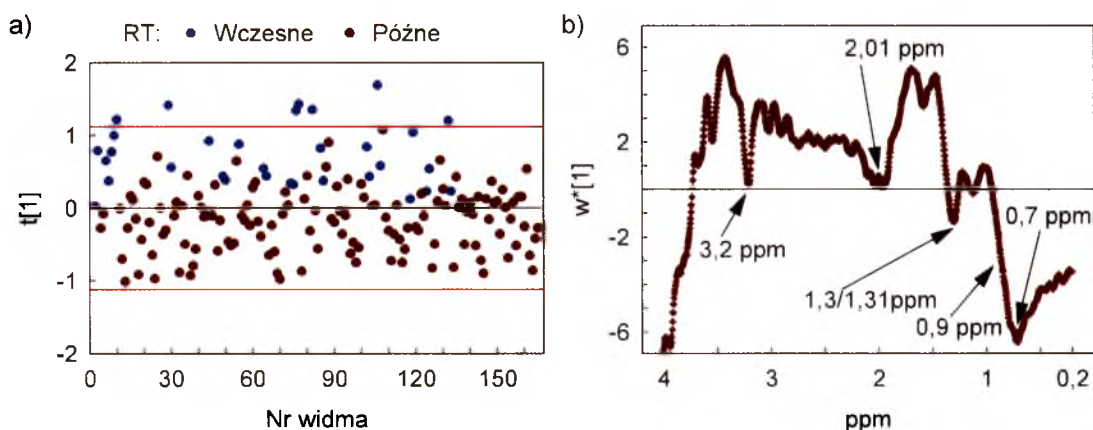
OSC	Deg. [°]	$R^2\text{OSC}$ [%]	Warunek istotności komponentu OSC
1	89,99	37,1	$R^2\text{OSC} [\%] > 2/\min(m,n) \cdot 100$ $2/164 \cdot 100 = 1,2$
2	89,96	22,5	
3	89,92	9,9	
4	89,99	7,7	
5	89,98	5,6	
6	89,95	4,4	
7	89,84	2,2	
8	89,95	1,7	
9	89,77	0,5	

Deg. – kąt pomiędzy kolejnymi wektorami t_{osc} i macierzą Y .

Tabela 7.17. Charakterystyka jakości modelu OSC PLS-DA-4.

LC	λ	R^2X [%]	R^2X (cum) [%]	R^2Y [%]	R^2Y (cum) [%]	Q^2 [%]	Q^2 (cum) [%]
1	26,2	16	16	40,2	40,2	35,6	35,6
2	11,5	7	23	4	44,2	-8,3	27,3

Analiza wykresów współrzędnych czynnikowych przypadków oraz wag dla modelu OSC PLS-DA-4 (rysunek 7.11) pokazuje, że jako cechy późnego odczynu popromiennego można wyróżnić dominujący sygnał nieznanego pochodzenia przy 0,7 ppm, sygnał Lip przy 0,9 ppm oraz – w mniejszym stopniu – sygnał Lip i/lub Lac przy 1,3 ppm. Ponadto wyraźnie widoczne jest obniżenie pozostałej części widma, co wskazuje na redukcję stężenia kreatyny i fosfokreatyny oraz mioinozytolu. Natomiast znormalizowane intensywności integralne sygnałów NAA (2,01 ppm) i tCho (3,2 ppm) są takie same w obu grupach widm. Cechy charakterystyczne dla wczesnych zmian popromiennych to brak wyraźnych sygnałów Lip i Lac oraz wyższe niż dla późnego odczynu sygnały głównych neurometabolitów (poza NAA i tCho).



Rysunek 7.11. Wykresy współrzędnych czynnikowych przypadków (a) oraz wag (b) modelu OSC PLS-DA-4.

Oceny istotności statystycznej cech różnicujących wczesne i późne zmiany popromienne (rysunek 7.11 a) dokonano za pomocą testu U M-W. Tabela 7.18 przedstawia otrzymane wyniki, a wartości istotne statystycznie są w niej oznaczone kolorem czerwonym. Hipoteza zerowa – o braku istotnego rozróżnienia pomiędzy analizowanymi grupami na wykresie wartości czynnikowych przypadków – może zostać odrzucona przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

Tabela 7.18. Wyniki testu U Manna-Whitneya dla rozkładów wartości współrzędnych czynnikowych przypadków z grup wczesnych i późnych zmian popromiennych.

Model OSC PLS-DA-4
Test U M-W: $Z = 7,61877$, $p = 0,0000$

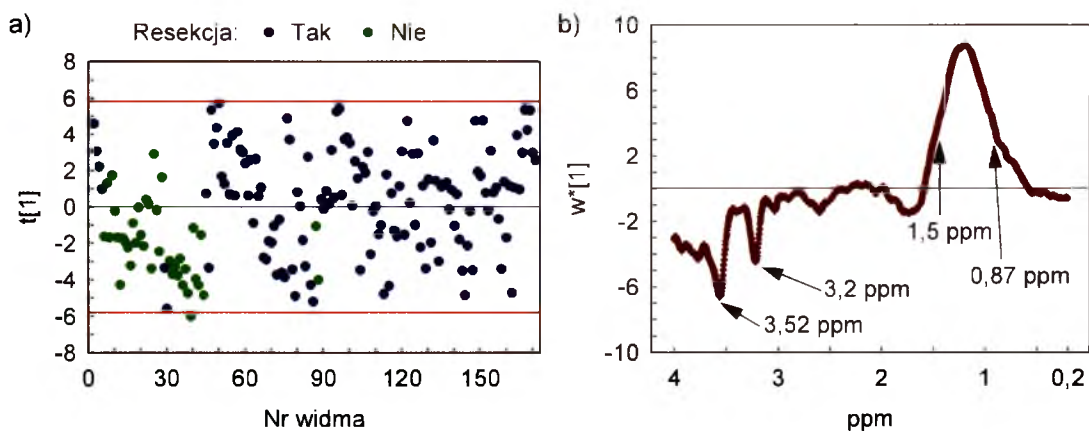
Z – wartości statystyki testu U M-W przybliżona rozkładem normalnym.

7.2.4.4 Rozróżnienie widm ^1H MRS ze względu na metaboliczną odpowiedź na przeprowadzoną resekcję guza

Analiza PLS-DA macierzy **X** przeprowadzona pod kątem wpływu resekcji guza na metabolizm mózdku dała w wyniku model PLS-DA-5 złożony z jednej istotnej składowej ukrytej, LC1 (tabela 7.19). Można zauważyć, że pomimo braku wyraźnej separacji analizowanych grup, zdecydowana większość widm pacjentów, u których nie przeprowadzono resekcji, znajduje się w ujemnej części wykresu współrzędnych czynnikowych przypadków (rysunek 7.12a). Jak wynika z wykresu wag (rysunek 7.12b), to różnice intensywności sygnałów zawartych w obszarze spektralnym pomiędzy 0,87 a 1,5 ppm oraz sygnałów tCho (3,2 ppm) i mI (3,52 ppm) stanowią prawdopodobne cechy dyskryminacyjne pomiędzy obiema grupami.

Tabela 7.19. Charakterystyka jakości modelu PLS-DA-5.

LC	λ	R^2X [%]	R^2X (cum) [%]	R^2Y [%]	R^2Y (cum) [%]	Q^2 [%]	Q^2 (cum) [%]
1	63,9	37,6	37,6	14,5	14,5	11,8	11,8
2	20,6	12,1	49,7	6	20,5	-8,7	3,1



Rysunek 7.12. Wykresy współrzędnych czynnikowych przypadków (a) oraz wag (b) modelu PLS-DA-5.

Podczas filtrowania OSC odjęto sześć komponentów OSC (tabela 7.20), następnie w wyniku analizy PLS-DA otrzymano model OSC PLS-DA-5 złożony z jednej istotnej składowej ukrytej, LC1 (tabela 7.21). Filtrowanie OSC znacznie poprawiło odseparowanie analizowanych grup, nie zmieniając przy tym charakterystyki profilu metabolicznego (rysunki 7.12 i 7.13), która pozostaje w zgodzie z rezultatami uzyskanymi dla modelu PLS-DA-5.

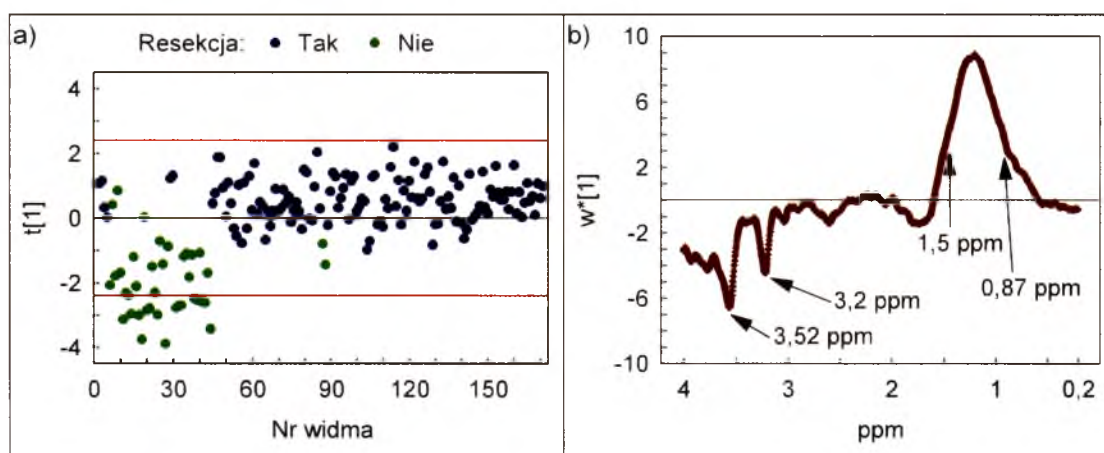
Tabela 7.20. Usuwanie z modelu PLS-DA-5 informacji niezwiązanej z odpowiedzią metaboliczną na resekcję guza.

OSC	Deg. [°]	R ² OSC [%]	Warunek istotności komponentu OSC
1	89,90	29	$R^2\text{OSC} [\%] > 2/\min(m,n) \cdot 100$ $2/170 \cdot 100 = 1,2$
2	89,98	22,3	
3	89,99	10,4	
4	89,80	1,7	
5	89,79	2,1	
6	89,61	2	
7	89,88	0,5	

Deg. – kąt pomiędzy kolejnymi wektorami t_{osc} i macierzą Y .

Tabela 7.21. Charakterystyka jakości modelu OSC PLS-DA-5.

LC	λ	R ² X [%]	R ² X (cum) [%]	R ² Y [%]	R ² Y (cum) [%]	Q ² [%]	Q ² (cum) [%]
1	26,2	23,6	23,6	65,6	65,6	64,4	64,4
2	11,5	14,1	37,7	0,2	65,8	-7,7	56,7



Rysunek 7.13. Wykresy współrzędnych czynnikowych przypadków (a) oraz wag (b) modelu OSC PLS-DA-5.

Do oceny istotności statystycznej rozróżnienia widm na wykresach wartości czynnikowych przypadków ze względu na przeprowadzoną lub nie resekcję guza (rysunki 7.12 a i 7.13 a) zastosowano test U M-W. Tabela 7.22 przedstawia otrzymane wyniki, a wartości istotne statystycznie są oznaczone w niej kolorem czerwonym. Hipoteza zerowa – o braku istotnego rozróżnienia pomiędzy analizowanymi grupami na wykresach wartości czynnikowych przypadków – może zostać odrzucona (przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$) dla każdego z analizowanych wykresów.

Tabela 7.22. Wyniki testu U Manna-Whitneya dla rozkładów wartości współrzędnych czynnikowych przypadków dla widm uzyskanych od pacjentów, u których przeprowadzono lub nie resekcję guza.

Model PLS-DA-5
Test U M-W: Z = 5,01629, p = 0,0001
Model OSC PLS-DA-5
Test U M-W: Z = 8,81141, p = 0,0000

Z – wartości statystyki testu U M-W przybliżona rozkładem normalnym.

7.2.4.5 Rozróżnienie widm ^1H MRS ze względu na metaboliczną odpowiedź na leczenie chemioterapią

Podobnie jak w przypadku powikłań po radioterapii, podczas analizy PLS-DA macierzy X pod kątem znalezienia metabolicznej odpowiedzi na chemioterapię, żadna z kilku pierwszych składowych ukrytych nie osiągnęła progu istotności. Po odjęciu ośmiu komponentów OSC (tabela 7.23) analiza PLS-DA dała w wyniku model OSC PLS-DA-6 złożony z jednej istotnej składowej ukrytej, LC1 (tabela 7.24)

Tabela 7.23. Usuwanie z modelu PLS-DA-6 informacji niezwiązanej z odpowiedzią metaboliczną na leczenie chemioterapią.

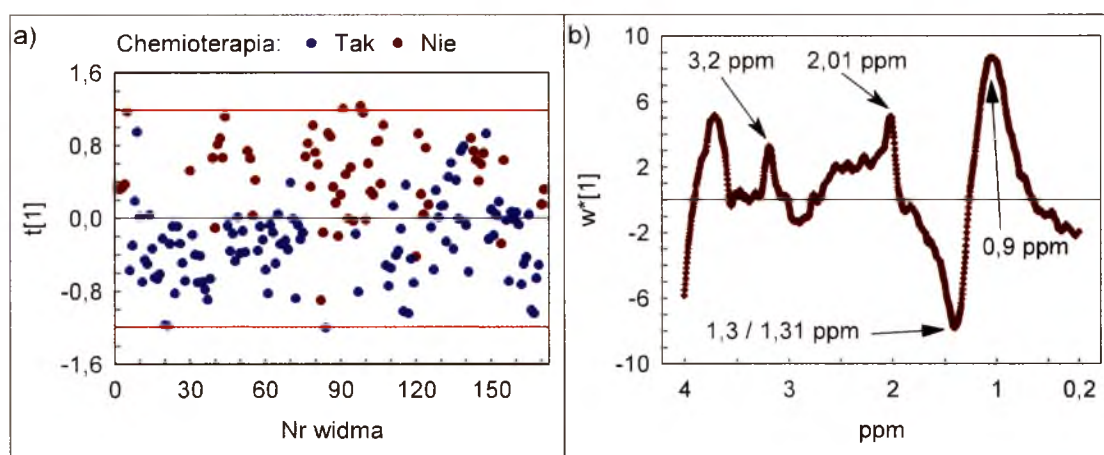
OSC	Deg. [°]	R ² OSC [%]	Warunek istotności komponentu OSC
1	89,98	37,9	$R^2\text{OSC} [\%] > 2/\min(m,n) \cdot 100$ $2/170 \cdot 100 = 1,2$
2	89,94	21,6	
3	89,98	9,6	
4	89,92	8,2	
5	89,95	5,5	
6	89,97	4,4	
7	89,90	2,1	
8	89,80	1,4	
9	89,80	0,5	

Deg. – kąt pomiędzy kolejnymi wektorami t_{osc} i macierzą Y.

Tabela 7.24. Charakterystyka jakości modelu OSC PLS-DA-6.

LC	λ	R^2X [%]	R^2X (cum) [%]	R^2Y [%]	R^2Y (cum) [%]	Q^2 [%]	Q^2 (cum) [%]
1	28,3	16,7	16,7	42,8	42,8	39,4	39,4
2	14	8,3	25	2,7	45,5	-6,3	33,1

Analiza wykresów współrzędnych czynnikowych przypadków oraz wag (rysunek 7.14) wskazuje, że cechą wyróżniającą grupę pacjentów leczonych chemioterapią są silne sygnały grupy metylenowej ($-\text{CH}_2$) Lip i/lub grupy metylowej ($-\text{CH}_3$) Lac, które dają sygnał przy 1,31 ppm. Natomiast widma pacjentów, którzy nie przeszli chemioterapii, wykazują wysoki sygnał Lip przy 0,9 ppm pochodzący od terminalnych grup metylowych oraz wyższe intensywności integralne sygnałów NAA (2,01 ppm), tCho (3,2 ppm) i Glx (3,76 ppm).



Rysunek 7.14. Wykresy współrzędnych czynnikowych przypadków (a) oraz wag (b) modelu OSC PLS-DA-6.

Oceny istotności statystycznej rozróżnienia widm na wykresie wartości czynnikowych przypadków otrzymanym jako wynik analizy danych pod kątem wpływu leczenia chemioterapią (rysunek 7.14 a) dokonano na podstawie testu t-Studenta (test ten zastosowano zamiast testu U M-W ze względu na jednorodną wariancję oraz zbliżony do normalnego rozkład współrzędnych czynnikowych przypadków dla obu analizowanych grup). Tabela 7.25 przedstawia otrzymane wyniki, a wartości istotne statystycznie są w niej oznaczone kolorem czerwonym. Hipoteza zerowa – o braku istotnego rozróżnienia pomiędzy analizowanymi grupami na wykresie wartości czynnikowych przypadków – może zostać odrzucona przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

Tabela 7.25. Wyniki testu t-Studenta dla rozkładów wartości współrzędnych czynnikowych przypadków dla widm uzyskanych od pacjentów, poddanych lub nie chemioterapii.

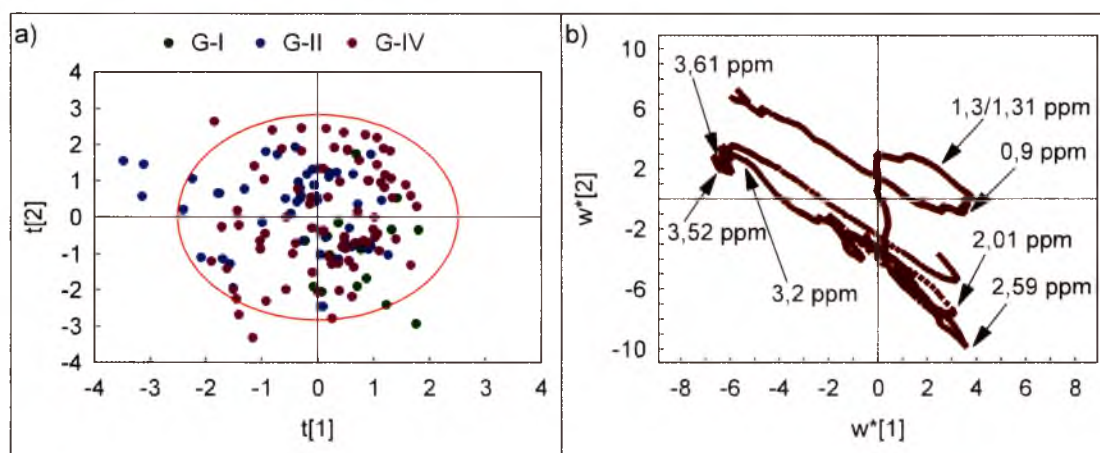
Model OSC PLS-DA-6
Test t-Studenta: $t = 11,2052$, $p = 0,0000$

7.2.4.6 Rozróżnienie widm ^1H MRS ze względu na stopień złośliwości nowotworu

Analiza PLS-DA macierzy \mathbf{X}_1 prowadzona pod kątem rozróżnienia widm ze względu na stopień złośliwości guza, dała w wyniku model PLS-DA-7 złożony z jednej istotnej składowej ukrytej, LC1 (tabela 7.26). Jednakże na podstawie otrzymanych wykresów współrzędnych czynnikowych przypadków oraz wag (rysunek 7.15) nie można określić różnic pomiędzy profilami metabolicznymi poszczególnych grup.

Tabela 7.26. Charakterystyka jakości modelu PLS-DA-7.

LC	λ	R^2X [%]	R^2X (cum) [%]	R^2Y [%]	R^2Y (cum) [%]	Q^2 [%]	Q^2 (cum) [%]
1	27,5	19,8	19,8	6,2	6,2	1,1	1,1
2	34,4	24,7	44,5	2,7	8,9	0,6	1,7
3	16,8	12,1	56,6	3	11,9	-5	-3,3



Rysunek 7.15. Wykresy współrzędnych czynnikowych przypadków (a) oraz wag (b) modelu PLS-DA-7.

W procedurze filtrowania OSC odjęto sześć komponentów OSC (tabela 7.27). Charakterystyka otrzymanego w ten sposób modelu PLS-DA (OSC PLS-DA-7) została przedstawiona w tabeli 7.28.

Tabela 7.27. Usuwanie z modelu PLS-DA-7 informacji niezwiązanej ze stopniem złośliwości nowotworu.

OSC	Deg. [°]	R ² OSC [%]	Warunek istotności komponentu OSC
1	89,91	34,5	$R^2\text{OSC} [\%] > 2/\min(m,n) \cdot 100$ $2/139 \cdot 100 = 1,4$
2	89,96	23,8	
3	89,98	10,5	
4	89,95	7	
5	89,93	5,5	
6	89,92	4	
7	89,83	0,7	

Deg. – kąt pomiędzy kolejnymi wektorami t_{osc} i macierzą Y.

Tabela 7.28. Charakterystyka jakości modelu OSC PLS-DA-7.

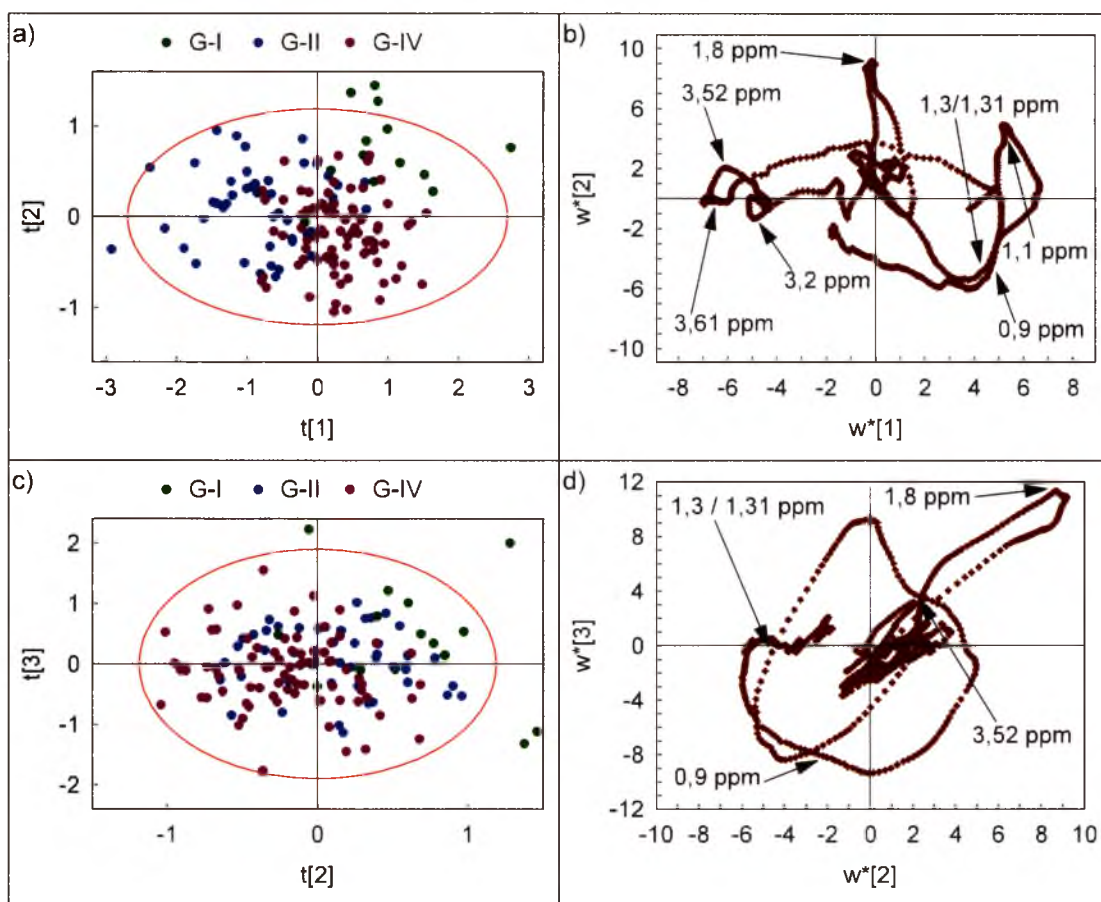
LC	λ	R ² X [%]	R ² X (cum) [%]	R ² Y [%]	R ² Y (cum) [%]	Q ² [%]	Q ² (cum) [%]
1	31,3	22,5	22,5	23,7	23,7	21,9	21,9
2	14,5	10,4	32,9	13,2	36,9	11,3	33,2
3	18,2	13,1	46	3,6	40,5	1,3	34,5
4	6,3	4,5	50,5	1,6	42,1	-9,2	25,3

Analiza wykresów współrzędnych czynnikowych przypadków wskazuje na dwie pierwsze składowe ukryte, LC1 i LC2, jako odpowiedzialne za częściowe grupowanie widm reprezentujących poszczególne stopnie złośliwości nowotworu (rysunek 7.16a). Trzecia składowa ukryta, LC3 (rysunek 7.16c), odpowiada w głównej mierze za wyjaśnienie wewnętrznej zmienności danych w grupie G-I (pierwszy stopień złośliwości), niż za relację pomiędzy danymi wejściowymi a przynależnością do danej grupy, na co wyraźnie wskazuje niewielka wartość R²Y dla tej składowej (tabela 7.28).

Pierwsza składowa ukryta, LC1, w sposób wyraźny separuje grupę G-II (rysunek 7.16a) gromadzącą widma otrzymane od pacjentów, u których zdiagnozowano astrocytomę i ependymomę (G-II), od grup G-I (hemangioblastoma) i G-IV (glioblastoma i medulloblastoma), a cechy spektralne wyróżniające grupę G-II to podwyższone sygnały tCho (3,2 ppm) i mI (3,52 i 3,61 ppm). Równocześnie grupy G-I i G-IV wykazują podwyższone sygnały pomiędzy 0,9 a 1,31 ppm, które odpowiadają sygnałom Lip i Lac (rysunek 7.16b). Druga składowa ukryta, LC2, odpowiada w głównej mierze za rozróżnienie pomiędzy grupami G-I i G-IV, wskazując na obecność intensywnego sygnału przy 1,8 ppm (przypuszczalnie pochodzącego od Ace lub GABA (załącznik, tabela 9.1)) w grupie G-I oraz na dominację sygnałów Lac i Lip/Lac przy 0,9 i 1,3/1,31

ppm na widmach zarejestrowanych dla grupy G-IV odpowiadającej nowotworom złośliwym.

Oceny istotności statystycznej rozróżnienia widm na wykresach wartości czynnikowych przypadków otrzymanych na podstawie analizy danych uwzględniającej stopień złośliwości nowotworu (rysunki 7.15 a i 7.16 a i c) dokonano na podstawie testów K-W. Tabela 7.29 przedstawia otrzymane wyniki, a wartości istotne statystycznie są oznaczone kolorem czerwonym. Hipoteza zerowa – o braku istotnego rozróżnienia pomiędzy analizowanymi grupami na wykresach wartości czynnikowych przypadków – może zostać odrzucona (przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$) dla każdego z analizowanych wykresów.



Rysunek 7.16. Wykresy współrzędnych czynnikowych przypadków $t[1]/t[2]$ (a) i $t[2]/t[3]$ (c) oraz wag $w^*[1]/w^*[2]$ (b) i $w^*[2]/w^*[3]$ (d) modelu OSC PLS-DA-7.

Dla modelu PLS-DA-7 statystycznie istotne okazują się być różnice pomiędzy G-I i G-II, G-II i G-IV względem pierwszej składowej ukrytej LC1, a także między G-I i G-II oraz G-I i G-IV względem drugiej składowej ukrytej LC2. Po filtrowaniu OSC (model OSC PLS-DA-7) wszystkie grupy różnią się istotnie statystycznie względem dwóch

pierwszych składowych ukrytych LC1 i LC2. Dla trzeciej składowej ukrytej, LC3, istotne statystycznie jest jedynie rozróżnienie pomiędzy grupami G-I i G-IV.

Tabela 7.29. Wyniki testów Kruskala-Wallisa dla rozkładów wartości współrzędnych czynnikowych przypadków otrzymanych w analizach uwzględniających stopień złośliwości nowotworu.

Model PLS-DA-7											
LC1						LC2					
Test K-W: $H_2 = 16,96997$, $p = 0,0002$						Test K-W: $H_2 = 8,55082$, $p = 0,0139$					
	G-I	G-II	G-IV				G-I	G-II	G-IV		
G-I		0,0005	0,1350	G-I				0,0105	0,0463		
G-II	0,0005		0,0081	G-II			0,0105		0,9577		
G-IV	0,1350	0,0081		G-IV			0,0463	0,9577			

Model OSC PLS-DA-7											
LC1				LC2				LC3			
Test K-W: $H_2 = 64,10953$, $p = 0,0000$				Test K-W: $H_2 = 30,33303$, $p = 0,0000$				Test K-W: $H_2 = 8,74686$, $p = 0,0126$			
	G-I	G-II	G-IV		G-I	G-II	G-IV		G-I	G-II	G-IV
G-I		0,0000	0,0382	G-I		0,0213	0,0000	G-I		0,8028	0,0329
G-II	0,0000		0,0000	G-II		0,0213	0,0024	G-II	0,8028		0,01112
G-IV	0,0382	0,0000		G-IV		0,0024		G-IV	0,0329	0,01112	

H_n – wartość statystyki testu K-W przybliżona rozkładem χ^2 , n – liczba stopni swobody.

7.2.4.7 Dyskusja

Wielowymiarowość danych oraz duża różnorodność nakładających się procesów metabolicznych skutecznie utrudniają skonstruowanie modeli PLS-DA o wysokiej jakości. Poprzedzenie analizy PLS-DA filtrowaniem OSC zdecydowanie poprawia sytuację. Nie udało się zbudować modeli PLS-DA zawierających istotne składowe ukryte (zgodnie z kryterium opisanym w podrozdziale 5.2.3), w przypadku gdy detekcji podlegały zmiany w metabolizmie wywołane chemioterapią oraz te charakterystyczne dla wczesnych i późnych efektów post-radiacyjnych. W pozostałych przypadkach kryterium istotności zostało spełnione przez jedną lub dwie składowe ukryte, jednak brak wyraźnego grupowania widm uniemożliwił rozpoznanie profili metabolicznych charakterystycznych dla analizowanych grup. Jedynie w analizach uwzględniających dane histopatologiczne (rysunek 7.6) oraz dane dotyczące resekcji guza (rysunek 7.12) zauważalny był słaby trend separacji poszczególnych grup widm.

Filtrowanie OSC wymagało (zgodnie z kryterium istotności komponentu OSC opisanym w podrozdziale 5.2.5) odjęcia od 4 do 8 komponentów OSC w celu usunięcia

z danych wejściowych informacji niezwiązanej z analizowanymi grupami. Po 8 komponentów OSC odjęto w analizach dotyczących powikłań po radio- i chemioterapii, co odzwierciedla subtelny charakter zmian w metabolizmie mózdku charakterystycznych dla powyższych metod terapeutycznych.

Wstępne filtrowanie OSC istotnie poprawia jakość zbudowanych modeli, a wyraźny wzrost wartości parametrów R^2Y oraz Q^2 świadczy o znalezieniu takich kierunków składowych ukrytych, które znacznie lepiej odzwierciedlają korelacje pomiędzy macierzami X i Y . Lepsza jakość uzyskanych modeli w bezpośredni sposób przekłada się na poprawę rozróżnienia poszczególnych grup widm, co jest widoczne na wszystkich wykresach wartości czynnikowych przypadków otrzymanych po filtrowaniu OSC.

Wyniki analiz danych spektroskopowych prowadzonych przy uwzględnieniu informacji histopatologicznych (model OSC PLS-DA-1, rysunek 7.7) znajdują potwierdzenie w piśmiennictwie [Imamura 2003, Li 2005, Negendank 1996]. Wspomniani autorzy podkreślają, że znaczny wzrost sygnałów lipidowych stanowi podstawowy wskaźnik biochemiczny glioblastomy. Wzrost stężenia wolnych związków lipidowych jest związany głównie z rozpadem błon komórkowych zachodzącym w wyniku procesów martwiczych [Negendank 1996].

Model OSC PLS-DA-1 (rysunek 7.7) wskazuje również na istotnie podwyższone stężenia mI oraz tCho w astrocytomach o niskim stopniu złośliwości, które to cechy potwierdzają inne prace (przy czym stężenie mI maleje wraz ze wzrostem złośliwości astrocytomy do stopia G-III) [Castillo 2000, Callot 2008, Howe 2003].

Obniżenie stężeń większości neurometabolitów i dominujące w widmie sygnały Lip to charakterystyczne cechy guza typu ependymoma (wyściółczak) [Tzika 2002a, Panigrahy 2006], choć pojawiają się w piśmiennictwie także doniesienia wskazujące na możliwość występowania w tym typie guzów podwyższonych sygnałów tCho i Lac [Cecil 2001] oraz mI [Harris 2007]. Model OSC PLS-DA-2 (rysunek 7.8) potwierdza obecność sygnałów Lip w ependymomie. Intensywne sygnały przy 3,25 i 3,42 ppm, które pochodzą od tauryny (Tau), są charakterystyczne dla medulloblastomy [Panigrahy 2006], jednakże w słabszych polach magnetycznych sygnały te pokrywają się z tCho oraz mI [de Graaff 2007], co może wyjaśniać wzrost intensywności integralnych pików tCho i mI na rysunku 7.8.

Model OSC PLS-DA-2 (rysunek 7.8) wskazuje na dodatnią korelację sygnałów w zakresach spektralnych 1,6 – 1,96 ppm oraz – w mniejszym stopniu – 0,86 – 1,24 ppm z hemangioblastomą. Powyższe zakresy spektralne obejmują sygnały pochodzące od

GABA (1,89 ppm), octanu 1,9 ppm), lizyny (1,72 ppm; aminokwasu który nie jest syntezowany w organizmie człowieka) oraz związków lipidowych (0,9 ppm). Hemangioblastoma – naczyniak krwionośny zarodkowy, jest nowotworem stosunkowo rzadko badanym spektroskopowo, a w skąpych doniesieniach w piśmiennictwie wymieniane są takie cechy tego guza jak nieznaczny wzrost tCho (3,2 ppm) w stosunku do grupy kontrolnej [Lee 1998, Costa 2002] czy możliwość pojawienia się Lac (1,31 ppm) i szczawiooctanu (2,37 ppm) [Vatsal 2002]. Jednakże podwyższony sygnał tCho oraz obecność sygnału Lac to cechy większości typów nowotworów pochodzenia neurogennego. Analiza pojedynczego przypadku hemangioblastomy opublikowana przez Isobe i współpracowników [Isobe 2010] ujawniła silnie podwyższone sygnały pomiędzy 0,9 a 1,4 ppm (odpowiadające prawdopodobnie związkowi lipidowemu, Lip) oraz stosunkowo niewielki wzrost tCho. Równocześnie autorzy stwierdzili obniżenie sygnału tCr oraz brak sygnałów NAA i Lac, co jest konsekwencją nieneurogennego pochodzenia tego guza. W przypadku modelu OSC PLS-DA-2 (rysunek 7.8) nie obserwujemy zaniku sygnału NAA ponieważ w objętości woksela znajdowała się jedynie szczątkowa masa guza (po całkowitej resekcji brak jest wskazań do leczenia uzupełniającego), a resztę stanowiła tkanka mózdku. Nie można wykluczyć niewielkiego wzrostu tCho, który jednak został zamaskowany przez wyraźny wzrost sygnału tCho w medulloblastomie (MD).

Monitorowanie efektów leczenia jest jednym z najważniejszych aspektów walki z chorobami nowotworowymi. Wiele prac wskazuje na istotny wzrost intensywności sygnałów Lip lub Lac przy 1,3 ppm oraz tCho w przypadku wznowy lub progresji guza, dotyczy to również proporcji Lip 1,3/0,9 oraz tCho/Cr [Matulewicz 2006, Bezabeh 2005]. Wysokie intensywności sygnałów Lip pochodzących od grupy metylenowej mogą wskazywać na proces zezłośliwiania nowotworu [Murphy 2003], a zdecydowany wzrost sygnału Lac koreluje z radykalnie zmniejszonym wskaźnikiem przeżywalności pacjentów leczonych z powodu glejaków złośliwych [Tarnawski 2002]. Model OSC PLS-DA-3 również ujawnia intensywne sygnały w okolicy 1,3 ppm jako charakteryzujące grupy progresji i wznowy (rysunek 7.10). Podwyższone sygnały Lip przy 0,9 ppm są widoczne w grupie niewykazującej cech guza (rysunek 7.10) i mogą być skojarzone z rozpadem błon komórkowych oraz ze zmianami mikromartwiczymi będącymi efektem ubocznym radioterapii [Negendank 1996]. Wzrost stężenia tCho jest zazwyczaj wiązany z procesami proliferacji w rozrastających się komórkach nowotworowych lub rozpadu błon komórkowych [De Graaf 2007]. Trzeba tu jednak wspomnieć także prace, które poddają

w wątpliwość traktowanie podwyższonego stężenia tCho jako jednoznacznego markera wznowy lub progresji nowotworu i sugerują brak istotnych różnic pomiędzy stężeniami tCho w przypadku guzów stabilnych i progresywnych lub wtórnych [Lehnhardt 2005, Tzika 2002b], lub nawet możliwość wyższych poziomów tCho w guzach stabilnych dla niektórych typów glejaków [Lehnhardt 2005]. Wnioski płynące z przeprowadzonej w tej pracy analizy PLS-DA także wskazują na nieznacznie podwyższone stężenie tCho w grupie guzów stabilnych (rysunek 7.10).

Martwica popromienna to jedno z głównych późnych powikłań radioterapii [Ruben 2006, Chong 1999], przy czym zmiany martwicze, demielinizacyjne, jak i inne uszkodzenia tkanki mózgowej spowodowane radioterapią są obserwowane nie tylko w obszarze największej dawki RT, ale również w oddalonych od zmiany nowotworowej częściach mózgu [Rutkowski 2003, Waldrop 1998, Walecki 1999, Matulewicz 2006b]. Martwica popromienna jest ostatnim, późnym stadium komplikacji, pojawiającym się po upływie kilkunastu tygodni, a nawet kilku miesięcy po ukończeniu leczenia, stąd przyjęty zgodnie z zaleceniami grupy RTOG próg 90 dni oddzielający wczesne i późne zmiany popromienne. Profil metaboliczny martwicy wykazuje silnie podwyższone sygnały Lip i Lac oraz praktycznie brak sygnałów innego pochodzenia [Tzika 2002b, Kamada 1997], co odpowiada profilowi metabolicznemu ujawnionemu przez model OSC PLS-DA-4 (rysunek 7.11). Jeśli jednak w objętości obszaru pomiarowego znajdzie się tkanka inna niż martwicza, w widmie mogą pojawić się sygnały pochodzące od pozostałych neurometabolitów. Wyraźny sygnał tCho – jeśli wykazuje intensywność integralną wyższą niż prawidłowa – może świadczyć o obecności tkanki nowotworowej [Tzika 2002a, Kizu 1998], natomiast dodatkowe pojawienie się sygnałów NAA i tCr pozwala przypuszczać o obecności tkanki zdrowej. Z kolei obniżenie intensywności sygnału tCr – co obserwuje się dla późnego odczynu popromiennego (rysunek 7.11) – może być związane ze spowolnieniem procesów energetycznych w napromienianej tkance. Natomiast redukcja sygnału mioinozytolu sugeruje, że późna reakcja popromienna dotyka w istotnej mierze komórek glejowych [Chan 2004]. Obniżenie stężenia mioinozytolu pojawia się w efekcie pęcznienia komórek w wyniku obrzęku, może też być związane ze stanami niedotlenienia mózgu [Kreis 1996].

Model OSC PLS-DA-5 skonstruowany na bazie widm zarejestrowanych u pacjentów, u których dokonano całkowitej lub częściowej resekcji guza, wskazuje na obecność intensywnych sygnałów rezonansowych w zakresie spektralnym od 0,87 do 1,5 ppm, które powiązać można przede wszystkim z Lip i Lac (rysunek 7.13). W kilku innych

pracach również zwrócono uwagę na możliwość zaburzania profilu metabolicznego mózgu przez resekcję. Sygnały Lip i Lac obserwowano w pobliżu łoża pooperacyjnej [Li 2005, Rutkowski 2003] oraz w pozostałych obszarach mózgu, po zastosowaniu radioterapii [Rutkowski 2003]. Obecność sygnałów Lip i Lac w obszarach mózgowia odległych od łoża może być spowodowana poważnym uszkodzeniem błon komórkowych, glikolizą beztlenową czy niedotlenieniem [Rutkowski 2003], natomiast pojawienie się ich w okolicy łoża może wynikać z infiltracji komórek nowotworowych do przylegających obszarów [Li 2005]. Innym efektem resekcji guza jest zmniejszenie wartości stosunku NAA/Cr [Rutkowski 2003], chociaż nie obserwuje się go dla widm rejestrowanych z wykorzystaniem długiego czasu echa TE [Waldrop 1998]. Natomiast w widmach NMR pacjentów, u których nie przeprowadzono resekcji dominują sygnały tCho i mI, mogące odzwierciedlać uszkodzenie błon komórkowych guza pod wpływem zastosowanego leczenia.

U pacjentów leczonych chemioterapią analiza PLS-DA (model OSC PLS-DA-6) ujawniła intensywny sygnał przy 1,3 ppm oraz obniżenie sygnałów rezonansowych pochodzących od pozostałych neurometabolitów (rysunek 7.14). W badaniach podatności bądź odporności na chemioterapię prowadzonych na komórkach nowotworowych zaobserwowano wzrost stężenia Lip (1,3 ppm) oraz obniżenie stężenia tCho, co miałyby wynikać z apoptycznej śmierci komórek podatnych na leczenie [Lindskog 2004]. Z drugiej strony badania *in vivo* ukierunkowane na znalezienie biochemicznej odpowiedzi zdrowej tkanki mózgu na zastosowaną chemioterapię ujawniają, że po początkowym spadku wartości proporcji NAA/Cho oraz NAA/Cr następuje ich istotny wzrost. Natomiast dla Cho/Cr jest widoczny początkowy wzrost wartości i późniejszy powrót do stanu początkowego [Chu 2003]. Waldrop i współautorzy postulują spadek wartości dla wszystkich trzech powyższych proporcji metabolitów, jednakże w ich pracy brak jest precyzyjnie określonego czasu, jaki upłynął od rozpoczęcia/zakończenia leczenia [Waldrop 1998]. Niestety bezpośrednie porównanie trendów zmian dla profili metabolicznych wyrażonych w postaci matematycznych proporcji i profili reprezentowanych przez stężenia bezwzględne poszczególnych metabolitów nie jest możliwe, ze względu na niestabilność stężenia kreatyny i fosfokreatyny, co zaburza proporcje [Li 2003].

Właściwa ocena typu oraz stopnia złośliwości nowotworu pozwala na zoptymalizowanie techniki leczenia oraz oszacowanie ryzyka wystąpienia wznowy choroby. Model OSC PLS-DA-7 wskazuje na korelację dodatnią sygnałów Lip (0,9 i 1,3

ppm) i Lac (1,31 ppm) z najwyższym, IV stopniem złośliwości nowotworu (rysunek 7.16). Jest to zapewne efekt wyraźnej dominacji tych sygnałów w widmie protonowym glioblastomy (G-IV) [Imamura 2003, Negendank 1996, Li 2005], co potwierdza na rysunku 7.7 analiza przeprowadzona ze względu na przynależność widm do danej grupy histopatologicznej (model OSC PLS-DA-1).

Podwyższone stężenie tCho, które z nielicznymi wyjątkami [Law 2003, Dowling 2001] jest raportowane jako jeden z markerów stopnia złośliwości nowotworu (i/lub natężenia procesów proliferacji komórek nowotworowych) [Chen 2006, Meyerand 1999, Fountans 2004, Herminghaus 2002], zostało przez model OSC PLS-DA 7, wraz z podwyższonym stężeniem mI, wskazane jako cecha dominująca w grupie o II stopniu złośliwości (rysunek 7.16). W grupie tej (G-II) większość stanowią przypadki astrocytomy (ASTR), której profil metaboliczny ujawnia właśnie wzrost tCho i mI [Castillo 2000, Callot 2008, Howe 2003]. Te obserwacje potwierdza również model OSC PLS-DA-1 wskazując na wzrost tCho i mI w astrocytomie (rysunek 7.7).

Zaskakuje profil metaboliczny otrzymany dla grupy nowotworów o najmniejszym stopniu złośliwości (G-I), który wykazuje podobieństwo do nowotworów złośliwych (G-IV) (rysunek 7.16). Grupa G-I, jako jedyna, była jednolita histopatologicznie i złożona wyłącznie z widm uzyskanych od pacjentów ze zdiagnozowaną hemangioblastomą. Modele OSC PLS-DA-1 i -2 ujawniły w hemangioblastomie wzrost stężeń w zakresie spektralnym 1,6 – 1,96 ppm oraz w mniejszym stopniu 0,86 – 1,24 ppm (rysunki 7.7 i 7.8), co może uzasadniać wynik otrzymany dla modelu OSC PLS-DA-7, czyli silnie podwyższony sygnał przy 1,8 ppm. Jednakże ta obserwacja nie znajduje poparcia w dostępnym piśmiennictwie [Lee 1998, Costa 2002, Vatsal 2002], chociaż Isobe [Isobe 2010] wskazuje na obecność podwyższonych sygnałów pomiędzy 0,9 a 1,4 ppm w hemangioblastomie.

Powyższe analizy zostały przeprowadzone równolegle na widmach ^1H MRS *in vivo* zarejestrowanych z dwóch obszarów anatomicznych: granicy guza lub łoża pooperacyjnej oraz tkanki odległej od miejsca zmiany nowotworowej. Stosunkowo niewielki rozmiar mózdzku, infiltracja komórek nowotworowych (również nowotworów łagodnych) w głąb zdrowej tkanki [Li 2005, Giese 2003], możliwość pojawiania się wznowy nowotworu nawet w odległości kilku centymetrów od brzegów łoża pooperacyjnej [Giese 2003] oraz często występujące powikłania po zastosowanym leczeniu mogą wpływać na metabolizm w praktycznie całym organie. Otrzymane wyniki zdają się potwierdzać tę hipotezę, ujawniając zaburzenia w profilach metabolicznych charakterystyczne dla działania

poszczególnych czynników wewnętrznych lub zewnętrznych, i choć nie dostarczają one dokładnych informacji o różnicach stężeń poszczególnych metabolitów, to znajdują istotne potwierdzenie w wielu pracach poświęconych zastosowaniom metody ^1H MRS w badaniach OUN [Callot 2008, de Graaf 2007, Immamura 2003, Li 2005, Rutkowski 2003].

Jednakże istotną strategią diagnostyki prowadzonej przy użyciu metody ^1H MRS *in vivo*, która pozwala nie tylko na lepszy wgląd w metabolizm mózdzku i monitorowanie leczenia nowotworów tylnego dołu czaszki, ale wydaje się być pomocna również przy określaniu stopnia uogólnionych zaburzeń metabolicznych, jest bezpośrednie porównanie profilu metabolicznego charakterystycznego dla guza lub tkanki znajdującej się w otoczeniu łoża po guzie z profilem rejestrowanym w obszarze odległym od zmiany nowotworowej.

7.2.5 Analiza i grupowanie widm ^1H MRS metodą PLS-DA z filtrowaniem OSC przy uwzględnieniu lokalizacji obszaru pomiarowego

Ze 170 widm zakwalifikowanych do wcześniejszych analiz 99 zostało zarejestrowanych z okolicy guza lub łoża pooperacyjnej, a pozostałe 71 z obszaru referencyjnego oddalonego od zmiany nowotworowej. Tabela 7.30 prezentuje charakterystyki macierzy danych analizowanych z uwzględnieniem rozróżnienia na obie lokalizacje. W przypadku braku danych klinicznych dla danego pacjenta, widma były wykluczane z analizy, stąd liczby widm w poszczególnych grupach są różne.

Analiza PLS-DA prowadzona bez filtrowania OSC dała w efekcie jedynie trzy modele zbudowane z istotnych składowych ukrytych – model rozróżniający widma ze względu na przynależność do grupy wyznaczonej na podstawie badań kontrolnych (dla widm zarejestrowanych na granicy guza/łoża, GR) oraz dwa modele rozróżniające widma pod kątem odpowiedzi tkanki na przeprowadzoną resekcję (odpowiednio dla widm zarejestrowanych na granicy guza/łoża i w obszarze referencyjnym, REF). Z tego powodu prezentacja wyników poniższych analiz została ograniczona jedynie do modeli analizujących dane poddane filtrowaniu OSC.

Tabela 7.30. Liczba widm (wraz z podziałem na klasy) uwzględnianych w analizach PLS-DA.

		Lokalizacja woksela			
		Granica guza/łoża (GR)		Obszar referencyjny (REF)	
Rodzaj analizy	Klasy	Liczba widm	Macierz danych	Liczba widm	Macierz danych
Typ guza	5	81	$\mathbf{X}_{\text{GR1}} (81 \times 928)$	58	$\mathbf{X}_{\text{REF1}} (58 \times 928)$
Badania kontrolne	4	97	$\mathbf{X}_{\text{GR2}} (97 \times 928)$	69	$\mathbf{X}_{\text{REF2}} (69 \times 928)$
Powikłania po RT	2	96	$\mathbf{X}_{\text{GR3}} (96 \times 928)$	68	$\mathbf{X}_{\text{REF3}} (68 \times 928)$
Resekcja guza	2	99	$\mathbf{X}_{\text{GR}} (99 \times 928)$	71	$\mathbf{X}_{\text{REF}} (71 \times 928)$
Chemioterapia	2	99	$\mathbf{X}_{\text{GR}} (99 \times 928)$	71	$\mathbf{X}_{\text{REF}} (71 \times 928)$
Stopień złośliwości guza	4	81	$\mathbf{X}_{\text{GR1}} (81 \times 928)$	58	$\mathbf{X}_{\text{REF1}} (58 \times 928)$

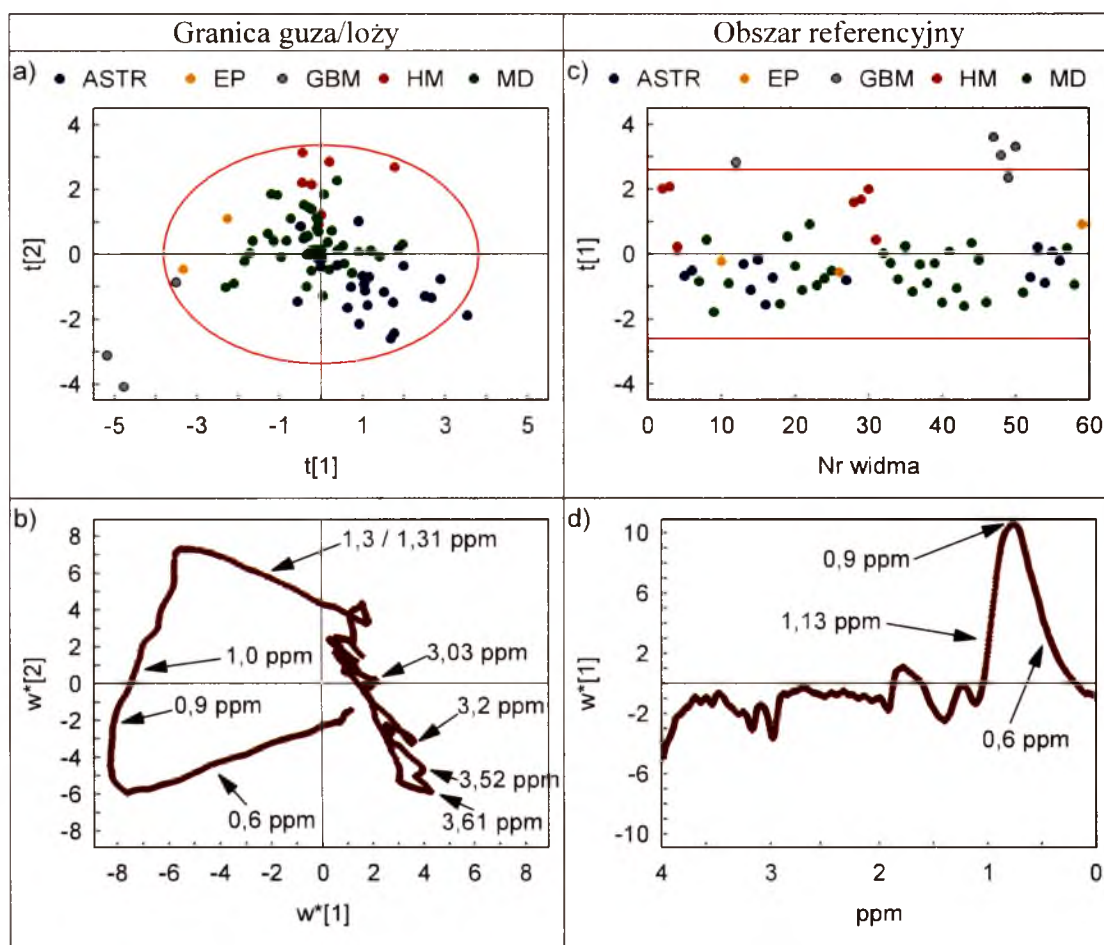
7.2.5.1 Rozróżnianie widm ^1H MRS dla grup histopatologicznych w zależności od lokalizacji obszaru pomiarowego

W wyniku analizy PLS-DA filtrowanych metodą OSC widm ^1H MRS uzyskanych na granicy guza/łoża oraz w obszarze referencyjnym otrzymano dwa modele OSC PLS-DA-8-GR i OSC PLS-DA-8-REF złożone odpowiednio z dwóch i jednej składowej ukrytej. Ich parametry zostały zestawione w tabeli 7.31.

**Tabela 7.31. Charakterystyka jakości modeli OSC PLS-DA-8-GR i OSC PLS-DA-8-REF
otrzymanych dla obu badanych lokalizacji.**

Lokalizacja obszaru pomiarowego	Odjęte komponenty OSC	LC	R ² X (cum) [%]	R ² Y (cum) [%]	Q ² (cum) [%]
OSC PLS-DA-8-GR Granica guza/łoży	3	2	40,8	28,6	15,4
OSC PLS-DA-8-REF Obszar referencyjny	4	1	26,9	19,1	13,5

Różnica w liczbie istotnych składowych ukrytych tych modeli znajduje odzwierciedlenie w wartościach parametrów R²Y i Q², odpowiadających za prawidłowe odwzorowanie podziału na predefiniowane klasy (tabela 7.31). Ponadto, model o dwóch składowych ukrytych, OSC PLS-DA-8-GR, pozwala na pogrupowanie widm względem większej liczby klas niż model o tylko jednej składowej ukrytej, OSC PLS-DA-8-REF (rysunek 7.17). Dlatego lokalizacja obszaru pomiarowego na granicy guza/łoży pooperacyjnej poprawia efektywność rozróżniania widm ¹H MRS pod kątem ich przynależności do grup histopatologicznych.



Rysunek 7.17. Wykresy współrzędnych czynnikowych przypadków t[1]/t[2] (a) i t[1] (c) oraz wag w*[1]/w*[2] (b) i w*[1] (d) modeli OSC PLS-DA-8-GR (a, b) i OSC PLS-DA-8-REF (c, d).

Porównanie wykresów wartości czynnikowych oraz wag dla obu lokalizacji (rysunek 7.17) potwierdza wyraźne odseparowanie widm grupy GBM (glioblastoma). Odpowiada za nie zakres spektralny od 0,6 ppm do 1,0 ppm – w przypadku widm pochodzących z okolic guza/łoży pooperacyjnej – lub od 0,6 do 1,13 ppm dla widm uzyskanych z obszaru referencyjnego.

Druga istotna składowa ukryta, LC2, w modelu OSC PLS-DA-8-GR pozwala na rozpoznanie zaburzeń metabolizmu tkanki mózgu charakterystycznych dla astrocytomy (ASTR) – takich jak podwyższona intensywność spektralna sygnałów mI przy 3,52 i 3,61 ppm oraz sygnału tCr przy 3,02 ppm, jak i częściowo dla hemangioblastomy (HM) – w tym przypadku obserwuje się podwyższone sygnały rezonansowe w zakresie 1,2 – 1,6 ppm.

Tabela 7.32. Wyniki testów Kruskala-Wallisa dla rozkładów wartości współrzędnych czynnikowych przypadków otrzymanych w analizach uwzględniających dane histopatologiczne.

Model OSC PLS-DA-8-GR						Model OSC PLS-DA-8-REF					
LC1						LC1					
Test K-W: H = 33,32923, p = 0,0000						Test K-W: H = 27,98257, p = 0,0000					
	HM	ASTR	MD	EP	GBM		HM	ASTR	MD	EP	GBM
HM		0,3211	1,0000	0,6361	0,1855	HM		0,0197	0,0023	1,0000	1,0000
ASTR	0,3211		0,0001	0,0148	0,0005	ASTR	0,0197		1,0000	1,0000	0,0033
MD	1,0000	0,0001		0,8750	0,2244	MD	0,0023	1,0000		1,0000	0,0004
EP	0,6361	0,0148	0,8750		1,0000	EP	1,0000	1,0000	1,0000		0,7894
GBM	0,1855	0,0005	0,2244	1,0000		GBM	1,0000	0,0033	0,0004	0,7894	
LC2											
Test K-W: H = 38,22136, p = 0,0238											
	HM	ASTR	MD	EP	GBM						
HM		0,0000	0,1664	1,0000	0,0009						
ASTR	0,0000		0,0001	1,0000	1,0000						
MD	0,1664	0,0001		1,0000	0,0384						
EP	1,0000	1,0000	1,0000		0,6938						
GBM	0,0009	1,0000	0,0384	0,6938							

H_n – wartość statystyki testu K-W przybliżona rozkładem χ^2 , n – liczba stopni swobody.

Oceny istotności statystycznej rozróżnienia widm na wykresach wartości czynnikowych przypadków ze względu na przynależność do danej grupy histopatologicznej (rysunek 7.17 a i c) dokonano na podstawie testów K-W. Tabela 7.32 przedstawia otrzymane wyniki, a wartości istotne statystycznie są w niej oznaczone kolorem czerwonym. Hipoteza zerowa – o braku istotnego rozróżnienia pomiędzy analizowanymi grupami na wykresach wartości czynnikowych przypadków – może

zostać odrzucona (przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$) dla każdego z analizowanych wykresów.

W modelu OSC PLS-DA-8-GR istotne statystycznie jest rozróżnienie pomiędzy astrocytomą (ASTR) a pozostałymi grupami względem pierwszej składowej ukrytej, LC1. Natomiast analiza rozkładu danych względem drugiej składowej ukrytej, LC2, pozwala uchwycić istotne statystycznie różnice pomiędzy astrocytomą (ASTR) a hemangioblastomą (HM) i medulloblastomą (MD) oraz pomiędzy glioblastomą (GBM) a medulloblastomą i hemangioblastomą. W modelu OSC PLS-DA-8-REF istotne statystycznie różnice profili metabolicznych w stosunku do profili astrocytomy i medulloblastomy wykazują hemangioblastoma i glioblastoma.

7.2.5.2 Rozróżnienie widm ^1H MRS ze względu na przynależność do grupy wyznaczonej na podstawie badań kontrolnych w zależności od lokalizacji obszaru pomiarowego

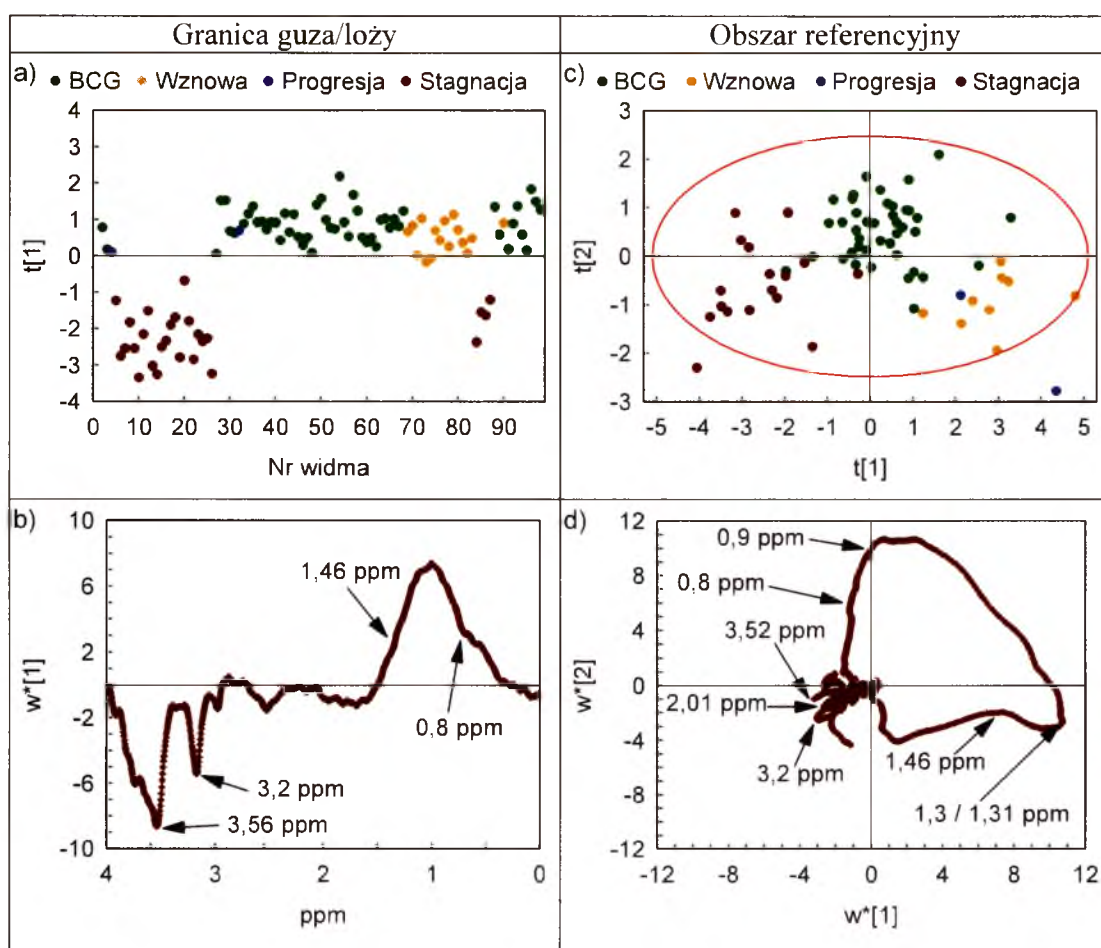
Tabela 7.33 przedstawia porównanie modeli, OSC PLS-DA-9-GR i OSC PLS-DA-9-REF, otrzymanych dla obu lokalizacji obszaru pomiarowego – przy łoży/guzie oraz z obszaru referencyjnego. Punktem wyjścia do tworzenia modeli były wyniki badań kontrolnych.

Wraz z liczbą istotnych statystycznie składowych ukrytych wyraźnie rośnie stopień wyjaśnionej wariancji związanej z przynależnością do danej klasy, jednak pomimo tego zdolność predykcyjna $Q^2(\text{cum})$ jest minimalnie większa dla modelu z tylko jedną istotną składową ukrytą (OSC PLS-DA-9-GR). Prawdopodobnie jest to związane z „pewnością” klasyfikacji tego modelu, gdzie (nawet przy założeniu błędnego przypisania klas wznowy i progresji do grupy BCG) ze względu na brak mieszania się widm najliczniejszych grup (BCG i Stagnacja), prawdopodobieństwo ich prawidłowej klasyfikacji jest większe (bliższe wartości 1) niż dla modelu OSC PLS-DA-9-REF (rysunek 7.18).

Tabela 7.33. Charakterystyka jakości modeli OSC PLS-DA-9-GR i OSC PLS-DA-9-REF otrzymanych dla obu badanych lokalizacji.

Lokalizacja obszaru pomiarowego	Odjęte komponenty OSC	LC	R^2X (cum) [%]	R^2Y (cum) [%]	Q^2 (cum) [%]
OSC PLS-DA-9-GR Granica guza/łoży	4	1	27,7	34,1	33,5
OSC PLS-DA-9-REF Obszar referencyjny	2	2	42,6	43,9	32,3

Pierwsza składowa ukryta, LC1, modelu OSC PLS-DA-9-GR ma największy wkład w rozróżnienie pomiędzy guzem stabilnym (grupa Stagnacja), dla którego widoczne są podwyższone intensywności spektralne sygnałów mI (3,52 i 3,61 ppm) oraz tCho (3,2 ppm), a pozostałymi grupami charakteryzowanymi przez wyraźne sygnały Lip i Lac (0,8 – 1,46 ppm). Jednakże dopiero model OSC PLS-DA-9-REF pozwala na odseparowanie widm pochodzących z grup Wznowa i Progresja, w których dominuje sygnał Lip/Lac przy 1,3 – 1,31 ppm. Pierwsza składowa ukryta, LC1, rozróżnia wznowę i progresję od grupy guza stabilnego, w której dominują sygnały NAA (2,01 ppm), tCho (3,2 ppm) i mI (3,52 i 3,61 ppm). Natomiast druga składowa ukryta, LC2, wskazuje na wyraźne sygnały Lip (0,9 ppm) w grupie BCG (brak cech guza).



Rysunek 7.18. Wykresy współrzędnych czynnikowych przypadków $t[1]$ (a) i $t[1]/t[2]$ (c) oraz wag $w^*[1]$ (b) i $w^*[1]/w^*[2]$ (d) modeli OSC PLS-DA-9-GR (a, b) i OSC PLS-DA-9-REF (c, d).

Oceny istotności statystycznej rozróżnienia widm na wykresach wartości czynnikowych przypadków otrzymanych dla grup wyznaczonych na podstawie badań kontrolnych (rysunek 7.18 a i c) dokonano na podstawie testów K-W. Tabela 7.34

przedstawia otrzymane wyniki, a wartości istotne statystycznie są oznaczone kolorem czerwonym. Hipoteza zerowa – o braku istotnego rozróżnienia pomiędzy analizowanymi grupami na wykresach wartości czynnikowych przypadków – może zostać odrzucona (przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$) dla każdego z analizowanych wykresów.

W modelu OSC PLS-DA-9-GR istotne statystycznie jest rozróżnienie pomiędzy stagnacją a grupami braku cech guza (BCG) oraz wznowy (Wznowa). W modelu OSC PLS-DA-9-REF grupa guza stabilnego (Stagnacja) różni się istotnie statystycznie od pozostałych grup wzdłuż pierwszej składowej ukrytej, LC1, a od grupy BCG różni się wzdłuż drugiej składowej ukrytej, LC2. Ponadto dla obu składowych ukrytych istotne statystycznie jest rozróżnienie pomiędzy grupami BCG i Wznowa.

Tabela 7.34. Wyniki testów Kruskala-Wallisa dla rozkładów wartości współrzędnych czynnikowych przypadków otrzymanych w analizach uwzględniających informacje pochodzące z badań kontrolnych.

Model OSC PLS-DA-9-GR					Model OSC PLS-DA-9-REF				
LC1					LC1				
Test K-W: H = 60,87389, p = 0,0000					Test K-W: H = 45,55965, p = 0,0000				
	BCG	Wznowa	Progresja	Stagnacja		BCG	Wznowa	Progresja	Stagnacja
BCG		0,3556	1,0000	0,0000	BCG		0,0050	0,5099	0,0000
Wznowa	0,3556		1,0000	0,0002	Wznowa	0,0050		1,0000	0,0000
Progresja	1,0000	1,0000		0,8002	Progresja	0,5099	1,0000		0,0024
Stagnacja	0,0000	0,0002	0,8002		Stagnacja	0,0000	0,0000	0,0024	
					LC2				
					Test K-W: H = 32,10324, p = 0,0000				
	BCG	Wznowa	Progresja	Stagnacja		BCG	Wznowa	Progresja	Stagnacja
BCG					BCG		0,0001	0,0591	0,0004
Wznowa					Wznowa	0,0001		1,0000	1,0000
Progresja					Progresja	0,0591	1,0000		1,0000
Stagnacja					Stagnacja	0,0004	1,0000	1,0000	

H_n – wartość statystyki testu K-W przybliżona rozkładem χ^2 , n – liczba stopni swobody.

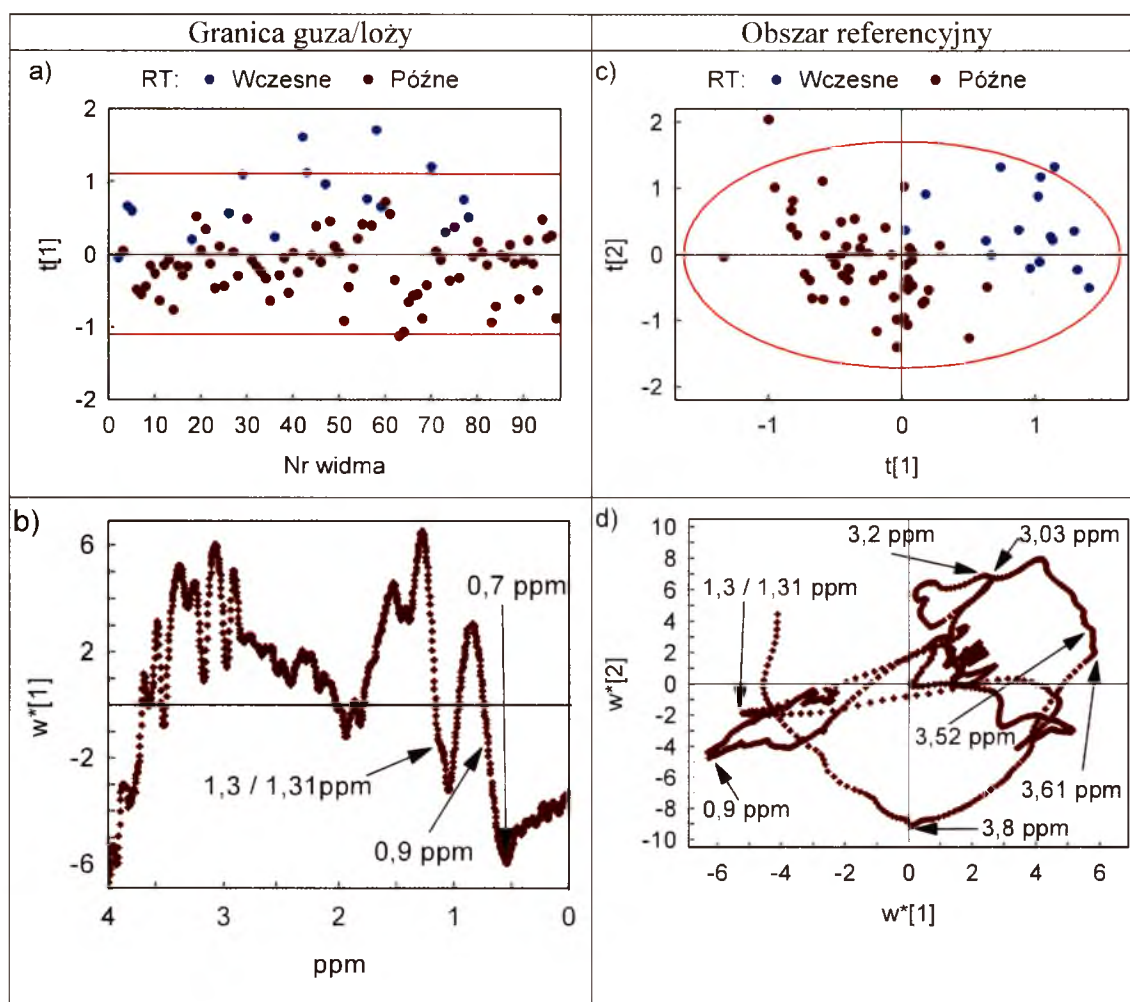
7.2.5.3 Rozróżnienie wczesnych i późnych powikłań po radioterapii na podstawie analizy widm ^1H MRS dla poszczególnych lokalizacji obszaru pomiarowego

Parametry opisujące jakość modeli OSC PLS-DA-10-GR i -REF uzyskanych w wyniku analizy danych spektroskopowych pod kątem wpływu radioterapii na metabolizm mózdzku znacznie się różnią dla obu modeli (tabela 7.35). Różnice te są wyraźnie widoczne już dla pierwszej składowej ukrytej, LC1, dla której w obu modelach parametry R^2X , R^2Y oraz Q^2 przyjmują, odpowiednio następujące wartości: 15,8, 62,4 i 54,8% (OSC PLS-DA-10-REF) oraz 13,1, 42,5 i 28,8% (OSC PLS-DA-10-GR). Jest to ważna

obserwacja, ponieważ to właśnie LC1 (ze względu na obecność tylko dwóch klas) w zdecydowanej mierze odpowiada za grupowanie analizowanych widm (rysunek 7.19), podczas gdy LC2 odpowiada raczej za zmienność w obrębie grup.

Tabela 7.35. Charakterystyka jakości modeli OSC PLS-DA-10-GR i OSC PLS-DA-10-REF otrzymanych dla obu badanych lokalizacji.

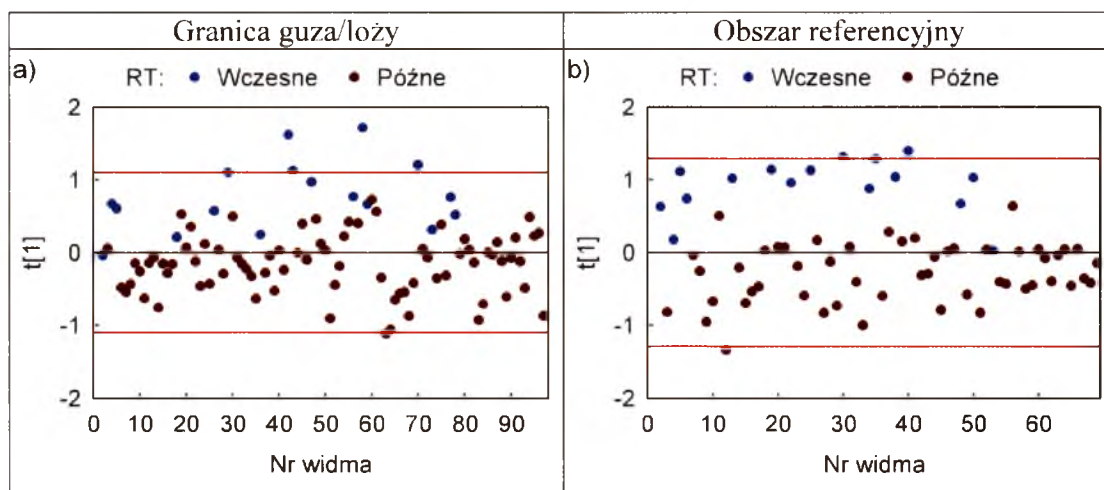
Lokalizacja obszaru pomiarowego	Odjęte komponenty OSC	LC	R^2X (cum) [%]	R^2Y (cum) [%]	Q^2 (cum) [%]
OSC PLS-DA-10-GR Granica guza/łoży	6	1	13,1	42,5	28,8
OSC PLS-DA-10-REF Obszar referencyjny	5	2	30,9	73,8	79,5



Rysunek 7.19. Wykresy współrzędnych czynnikowych przypadków t[1] (a) i t[1]/t[2] (c) oraz wag $w^*[1]$ (b) i $w^*[1]/w^*[2]$ (d) modeli OSC PLS-DA-10-GR (a, b) i OSC PLS-DA-10-REF (c, d).

Niezależnie od anatomicznego ulokowania obszaru pomiarowego cechą charakterystyczną dla późnych powikłań po radioterapii jest pojawienie się wyraźnych sygnałów Lip i Lac (0,9 i 1,3/1,31 ppm) oraz zmniejszenie intensywności sygnałów rezonansowych pochodzących od pozostałych neurometabolitów (z wyłączeniem NAA przy 2,01 ppm), co jest widoczne na rysunku 7.19. Co więcej, dla obszaru umiejscowionego na granicy guza/łoży pooperacyjnej maksima widoczne w profilu metabolicznym późnych powikłań popromiennych są przesunięte o 0,2 ppm w kierunku wyższego pola (czyli niższych wartości ppm).

Rysunek 7.20 przedstawia porównanie wykresów wartości czynnikowych $t[1]$ dla obu zbudowanych modeli. Już na pierwszy rzut oka rozróżnienie obu grup – wczesnych i późnych odczynów popromiennych – jest lepsze dla obszaru referencyjnego, co bezpośrednio odzwierciedla jakość uzyskanego modelu (tabela 7.35).



Rysunek 7.20. Wykresy współrzędnych czynnikowych przypadków $t[1]$ modeli OSC PLS-DA-10-GR (a) i OSC PLS-DA-10-REF (b).

Oceny istotności statystycznej rozróżnienia widm na wykresach wartości czynnikowych przypadków otrzymanych w analizie danych spektroskopowych prowadzonej pod kątem detekcji wczesnych i późnych zmian popromiennych (rysunek 7.19 a i c) dokonano na podstawie testu U M-W. Tabela 7.36 przedstawia otrzymane wyniki, a wartości istotne statystycznie są oznaczone kolorem czerwonym. Hipoteza zerowa – o braku istotnego rozróżnienia analizowanych grup na wykresach wartości czynnikowych przypadków – może zostać odrzucona (przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$) dla każdego z analizowanych wykresów.

Tabela 7.36. Wyniki testów U Manna-Whitneya dla rozkładów wartości współrzędnych czynnikowych otrzymanych w analizach rozróżnienia wczesnych i późnych powikłań popromiennych.

Model OSC PLS-DA-10-GR Test U M-W	Model OSC PLS-DA-10-REF Test U M-W
LC1 Z = 5,73462, p = 0,0000	LC1 Z = 5,725318, p = 0,0000
	LC2 Z = 2,92049, p = 0,0035

Z – wartości statystyki testu U M-W przybliżona rozkładem normalnym.

7.2.5.4 Ocena odpowiedzi tkanki mózdku na przeprowadzoną resekcję guza na podstawie analizy widm ^1H MRS z uwzględnieniem lokalizacji obszaru pomiarowego

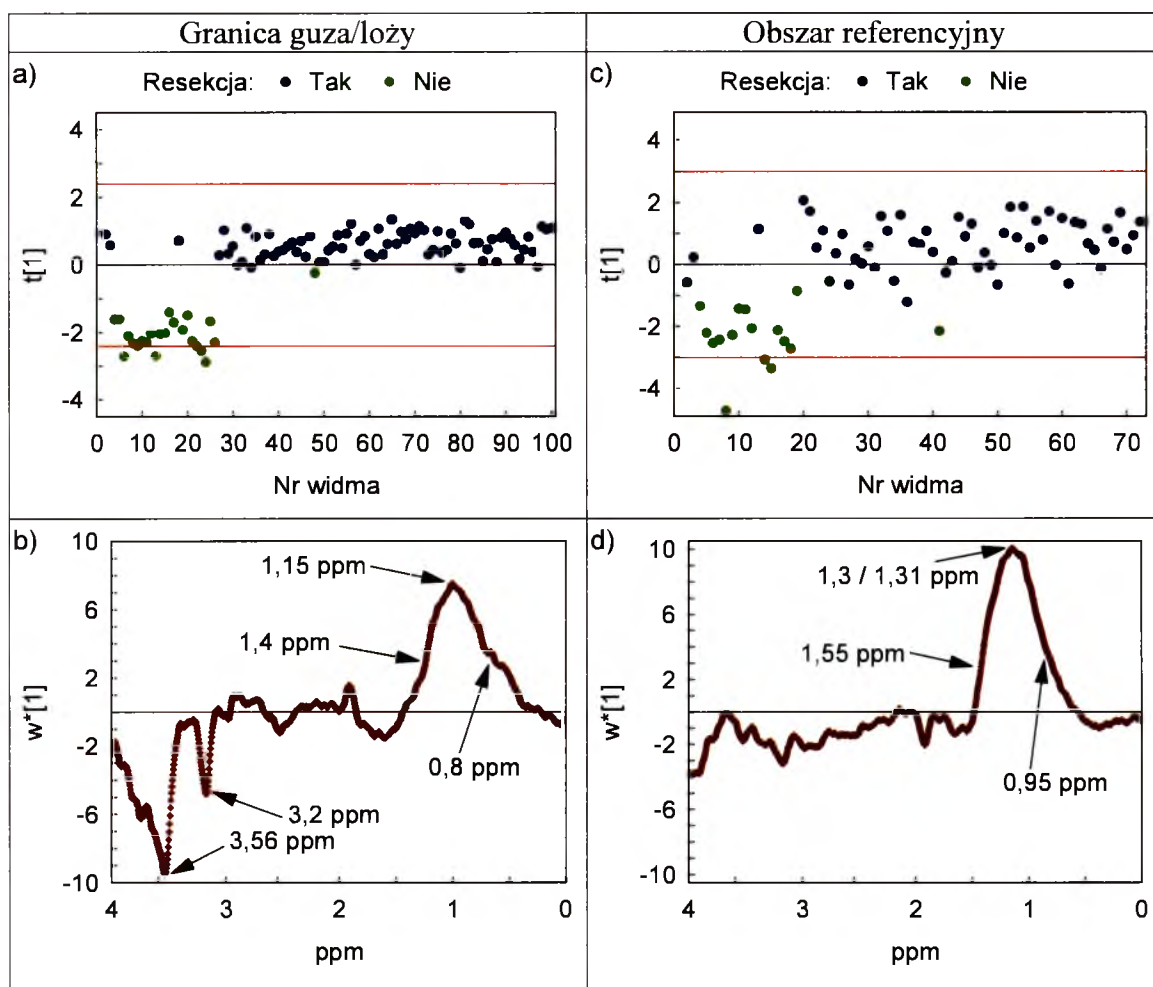
W przypadku resekcji guza otrzymane modele OSC PLS-DA-11-GR i -REF wykazują nie tylko różnice w wartościach parametrów R^2X , R^2Y oraz Q^2 (tabela 7.37), ale również ujawniają odmienne dla obu badanych lokalizacji obszaru pomiarowego profile metaboliczne (rysunek 7.21). W odróżnieniu od modeli wyznaczonych w celu charakteryzowania powikłań po RT, tym razem to model analizujący widma pochodzące z okolic guza/łoży pooperacyjnej (OSC PLS-DA-11-GR) okazuje się wносить więcej informacji. Różnice wartości parametrów jakościowych dla obu zbudowanych modeli (tabela 7.36) znajdują odzwierciedlenie w zdecydowanie lepszym grupowaniu widm na wykresach współrzędnych czynnikowych przypadków (rysunki 7.21 a i c) modelu OSC PLS-DA-11-GR. Jednym z powodów lepszego rozróżnienia obu grup przez ten model może być silniejsza filtracja OSC (tabela 7.37) – usunięcie większej ilości zbędnych informacji „oczyszcza” dane i poprawia klasyfikację.

Tabela 7.37. Charakterystyka jakości modeli OSC PLS-DA-11-GR i OSC PLS-DA-11-REF otrzymanych dla obu badanych lokalizacji.

Lokalizacja obszaru pomiarowego	Odjęte komponenty OSC	LC	R^2X (cum) [%]	R^2Y (cum) [%]	Q^2 (cum) [%]
OSC PLS-DA-11-GR Granica guza/łoży	5	1	25,7	87,6	86,7
OSC PLS-DA-11-REF Obszar referencyjny	3	1	23,9	70,8	67,2

Porównanie wykresów wartości czynnikowych i wag (rysunek 7.21) wskazuje, że dla obu lokalizacji obszaru pomiarowego zakres widmowy skorelowany dodatnio

z resekcją guza jest inny. Na widmach zarejestrowanych w obszarach ulokowanych na granicy guza/łoży pooperacyjnej obserwowane są intensywne sygnały w przedziale od 0,8 do 1,4 ppm (głównie pochodzenia lipidowego) z maksimum wypadającym przy 1,15 ppm (rysunki 7.21 a i b), natomiast w obszarze referencyjnym zakres ten leży pomiędzy 0,95 a 1,55 ppm, a maksimum wypada w 1,3/1,31 ppm, co wskazuje na dominujący sygnał grupy metylowej Lac i/lub grupy metylenowej Lip (rysunki 7.21 c i d). Ponadto na granicy guza/łoży stężenia tCho (sygnał przy 3,2 ppm) oraz przypuszczalnie mI (sygnał przy 3,56 ppm) są zdecydowanie niższe u pacjentów, którzy przeżyli resekcję guza (rysunki 7.21 a i b).



Rysunek 7.21. Wykresy współrzędnych czynnikowych przypadków $t[1]$ (a) i (c) oraz wag $w^*[1]$ (b) i (d) modeli OSC PLS-DA-11-GR (a, b) i OSC PLS-DA-11-REF (c, d).

Porównanie powyższych wyników z rezultatami analizy PLS-DA przeprowadzonej bez uwzględniania lokalizacji obszaru pomiarowego (podpunkt 7.2.4.4, model OSC PLS-DA-5) pozwala wnioskować, że profil metaboliczny otrzymany dla grupy, u której dokonano resekcji guza, i przedstawiony na rysunku 7.12 b jest w rzeczywistości sumą

profilu metabolicznych otrzymanych osobno dla każdej z lokalizacji obszaru pomiarowego (rysunki 7.21 b i d).

Oceny istotności statystycznej rozróżnienia widm na wykresach wartości czynnikowych przypadków otrzymanych dla danych posegregowanych ze względu na przeprowadzoną lub nie resekcję guza (rysunek 7.21 a i c) dokonano na podstawie testu U M-W. Tabela 7.38 przedstawia te wyniki, a wartości istotne statystycznie są oznaczone kolorem czerwonym. Hipoteza zerowa – o braku istotnego rozróżnienia pomiędzy analizowanymi grupami na wykresach wartości czynnikowych przypadków – może zostać odrzucona (przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$) dla każdego z analizowanych wykresów.

Tabela 7.38. Wyniki testów U Manna-Whitneya dla rozkładów wartości współrzędnych czynnikowych przypadków otrzymanych w analizach uwzględniających informacje o resekcji guza.

Model OSC PLS-DA-11-GR Test U M-W	Model OSC PLS-DA-11-REF Test U M-W
LC1 $Z = 7,2416, p = 0,0000$	LC1 $Z = 6,0415, p = 0,0000$

Z – wartości statystyki testu U M-W przybliżona rozkładem normalnym.

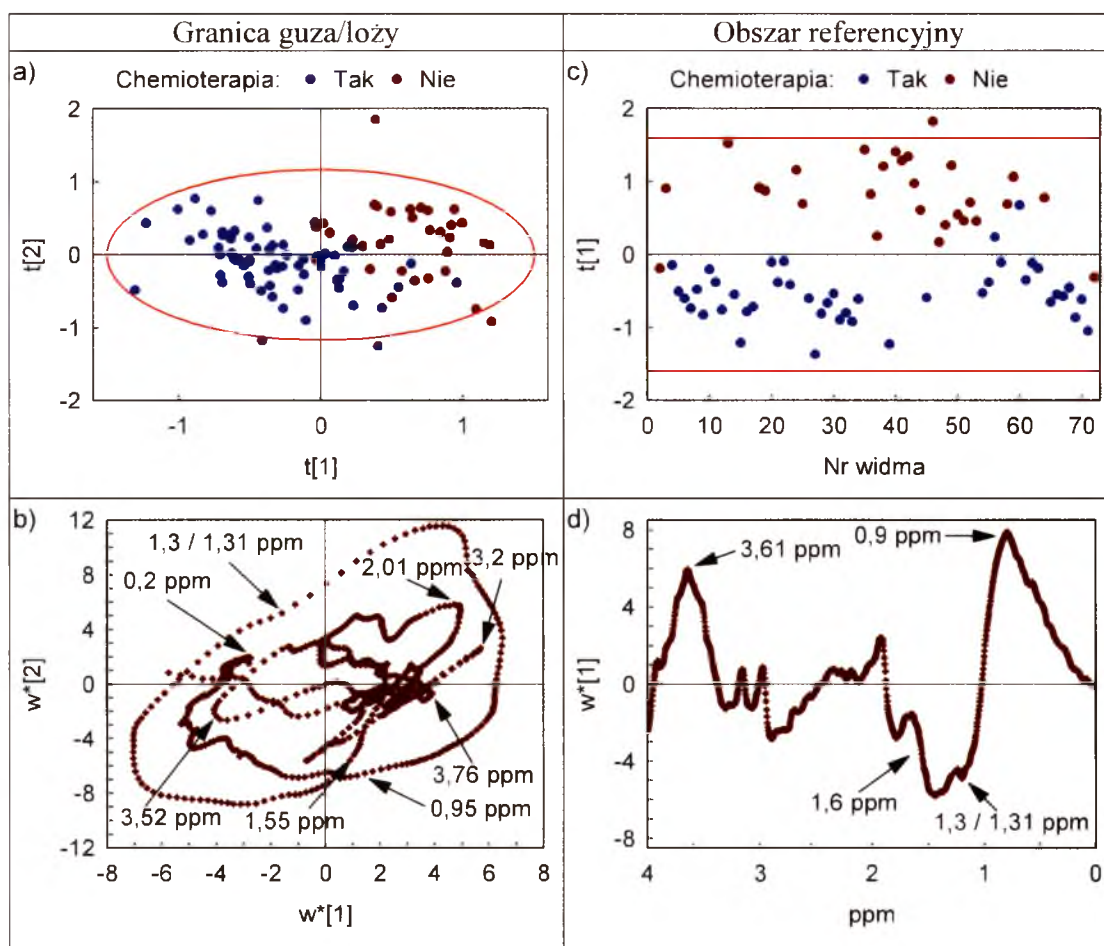
7.2.5.5 Metaboliczna odpowiedź na chemioterapię – rozróżnianie widm ^1H MRS z uwzględnieniem lokalizacji obszaru pomiarowego

Lokalizacja obszaru pomiarowego ma wpływ na jakość modeli OSC PLS-DA również w przypadku analizy widm pochodzących od pacjentów. Model OSC PLS-DA-12-REF charakteryzuje się wyższą jakością (większe wartości parametrów R^2Y i Q^2) niż OSC PLS-DA-12-GR, pomimo iż jest zbudowany tylko z jednej istotnej składowej ukrytej, LC1 (tabela 7.39).

Tabela 7.39. Charakterystyka jakości modeli OSC PLS-DA-12-GR i OSC PLS-DA-12-REF otrzymanych dla obu badanych lokalizacji.

Lokalizacja obszaru pomiarowego	Odjęte komponenty OSC	LC	R^2X (cum) [%]	R^2Y (cum) [%]	Q^2 (cum) [%]
OSC PLS-DA-12-GR Granica guza/łoży	6	2	23,8	64,8	50,5
OSC PLS-DA-12-REF Obszar referencyjny	5	1	19	71,3	66,9

Zbudowane modele nie tylko różnią się jakością, lecz dostarczają również nieco odmiennych profili metabolicznych, co pokazuje rysunek 7.22. W przypadku obszaru referencyjnego (OSC PLS-DA-12-REF) dla grupy pacjentów poddanych chemioterapii otrzymano prosty w interpretacji profil metaboliczny, w którym dominuje pasmo pomiędzy 1,2 a 1,68 ppm (Lip/Lac, Ala) oraz sygnał przy 1,9 ppm (Ace). Ponadto, intensywności spektralne sygnałów NAA (2,01 ppm) oraz ml (3,52 i 3,61 ppm) są zdecydowanie niższe u pacjentów leczonych chemioterapią niż dla pacjentów bez chemioterapii, u których dodatkowo obserwuje się intensywny sygnał Lip przy 0,9 ppm (rysunki 7.22 c i d).



Rysunek 7.22. Wykresy współrzędnych czynnikowych przypadków $t[1]/t[2]$ (a) i $t[1]$ (c) oraz wag $w^*[1]/w^*[2]$ (b) i $w^*[1]$ (d) modeli OSC PLS-DA-12-GR (a, b) i OSC PLS-DA-12-REF (c, d).

Profil metaboliczny ujawniony przez model OSC PLS-DA-12-GR jest bardziej złożony, jednakże można wskazać zakres od 1,3 do 1,55 ppm jako dominujący w widmach ^1H MRS pacjentów leczonych chemioterapią. Zakres ten zawiera sygnały Lip/Lac oraz Ala. Kolejną cechą charakterystyczną widm zarejestrowanych dla tej grupy

jest podniesiony początkowy zakres widma (pomiędzy 0,2 – 0,95 ppm) oraz podwyższona intensywność spektralna sygnału mI przy 3.52 ppm (rysunki 7.22 a i b). Natomiast w grupie pacjentów nie poddanych chemioterapii widoczne są zdecydowanie wyższe sygnały NAA (2,01 ppm), tCho (3,2 ppm) i Glx (3,76 ppm) oraz intensywny sygnał w zakresie spektralnym pomiędzy 0,95 a 1,3 ppm należący najprawdopodobniej do makromolekuł białkowych.

Analiza modeli OSC PLS-DA-12-GR, OSC PLS-DA-12-REF (rysunek 7.22) oraz OSC PLS-DA-6 (rysunek 7.14) pozwala wnioskować, że sygnały w okolicy 1,3 – 1,6 ppm to niezależna od lokalizacji, charakterystyczna cecha widm rejestrowanych u pacjentów poddawanych chemioterapii. U pacjentów, u których nie stosowano chemioterapii, profil metaboliczny jest zależny od lokalizacji obszaru pomiarowego – na granicy guza/łoży obserwowane są wyższe intensywności sygnałów NAA (2,01 ppm) oraz tCho (3,2 ppm) w stosunku do pacjentów poddanych chemioterapii, natomiast w obszarze referencyjnym intensywności sygnałów NAA i tCho nie różnią się pomiędzy grupami.

Model OSC PLS-DA-6 analizujący widma bez podziału na lokalizację obszaru pomiarowego również wykazał wzrost NAA i tCho w grupie bez chemioterapii, co można tłumaczyć uśrednieniem profili metabolicznych dla obu lokalizacji obszaru pomiarowego.

Ocenę istotności statystycznej rozróżnienia widm na wykresach wartości czynnikowych przypadków ze względu na zastosowanie lub nie leczenia chemioterapią (rysunek 7.22 a i c) przeprowadzono za pomocą testu U M-W. Tabela 7.40 przedstawia wyniki testu, a wartości istotne statystycznie są oznaczone kolorem czerwonym. Hipoteza zerowa – o braku istotnego rozróżnienia pomiędzy analizowanymi grupami na wykresach wartości czynnikowych przypadków – może zostać odrzucona (przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$) dla każdego z analizowanych wykresów.

Tabela 7.40. Wyniki testów U Manna-Whitneya dla rozkładów wartości współrzędnych czynnikowych przypadków otrzymanych w analizach uwzględniających zastosowanie chemioterapii.

Model OSC PLS-DA-12-GR Test U Manna-Whitneya:	Model OSC PLS-DA-12-REF Test U Manna-Whitneya
LC1 Z = 7,1852, p = 0,0000	LC1 Z = 6,8005, p = 0,0000
LC2 Z = 3,3179, p = 0,0009	

Z – wartości statystyki testu U M-W przybliżona rozkładem normalnym.

7.2.5.6 Rozróżnienie widm ^1H MRS ze względu na stopień złośliwości nowotworu z uwzględnieniem lokalizacji obszaru pomiarowego

Tabela 7.41 przedstawia porównanie modeli, OSC PLS-DA-13-GR i OSC PLS-DA-13-REF, otrzymanych dla obu lokalizacji obszaru pomiarowego – przy łoży/guzie oraz z obszaru referencyjnego i grupujących widma NMR względem stopnia złośliwości nowotworu. Podobnie jak w przypadku analizy uwzględniającej informacje zebrane w badaniach kontrolnych (punkt 7.2.5.2), model OSC PLS-DA-13-REF charakteryzuje się wyższą wartością parametru R^2Y , niż model OSC PLS-DA-13-GR otrzymany dla obszaru ułożowanego na granicy łoży pooperacyjnej lub guza. Jednak nie towarzyszy temu zwiększenie zdolności predykcyjnej $Q^2(\text{cum})$ modelu OSC PLS-DA-13-REF (tabela 7.41). Również uzyskane profile metaboliczne różnią się w zależności od lokalizacji obszaru pomiarowego.

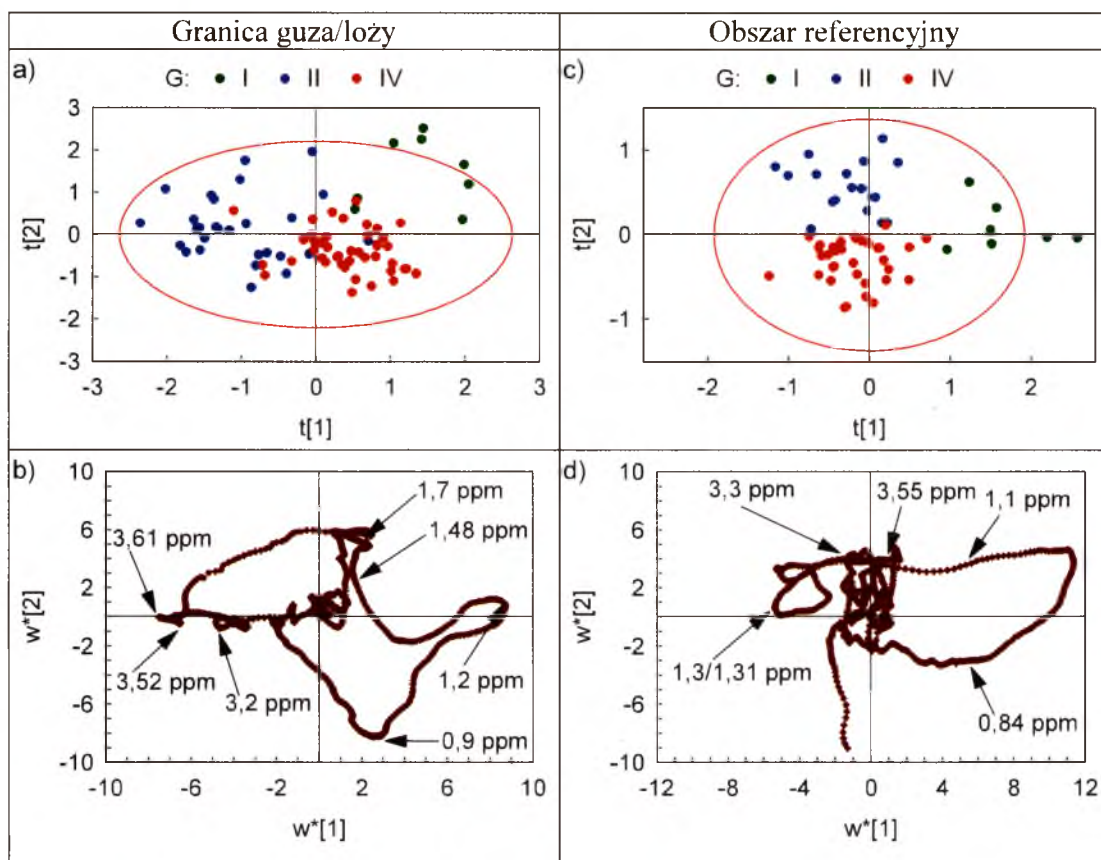
Tabela 7.41. Charakterystyka jakości modeli OSC PLS-DA-13-GR i OSC PLS-DA-13-REF otrzymanych dla obu badanych lokalizacji.

Lokalizacja obszaru pomiarowego	Odjęte komponenty OSC	LC	R^2X (cum) [%]	R^2Y (cum) [%]	Q^2 (cum) [%]
OSC PLS-DA-13-GR Granica guza/łoży	4	2	33,7	54	46,5
OSC PLS-DA-13-REF Obszar referencyjny	4	2	29,9	68,1	41,6

Dla nowotworów o najniższym stopniu złośliwości (G-I), na granicy guza/łoży pooperacyjnej obserwuje się podwyższenie intensywności spektralnej pasma pomiędzy 1,48 a 1,95 ppm, z maksimum przypadającym na 1,7 ppm, co odpowiada sygnałom pochodzącym od Ala, makromolekuł białkowych, GABA i Ace, oraz podwyższoną intensywność sygnałów w okolicy 1,2 ppm (rysunek 7.23 a i b). Profil metaboliczny nowotworów grupy G-II wykazuje zdecydowanie wyższe intensywności spektralne sygnałów tCho (3,2 pm) oraz mI (3,52 i 3,61 ppm), natomiast w przypadku nowotworów złośliwych (G-IV) stwierdza się korelację dodatnią z sygnałem Lip przy 0,9 ppm (rysunek 7.23 a i b).

W przypadku obszaru referencyjnego, charakterystyczne dla poszczególnych stopni złośliwości nowotworu cechy spektralne, są inne niż dla obszaru ułożowanego na granicy łoży/guza. Wzdłuż pierwszej składowej ukrytej, LC1, modelu OSC PLS-DA-13-REF (rysunek 7.23 c i d) widoczna jest wyraźna separacja grupy G-I – za co odpowiadają podwyższone stężenia w zakresie spektralnym pomiędzy 0,84 a 1,1 ppm pochodzące od

sygnałów Lip. Równocześnie ta sama składowa ukryta wskazuje na ujemną korelację sygnału Lac (1,31 ppm) z grupą G-I. Druga składowa ukryta, LC2, w sposób wyraźny rozróżnia grupy G-II i G-IV. Rozróżnienie to jest efektem dodatniej (G-II) i ujemnej (G-IV) korelacji tych grup z sygnałami w zakresie spektralnym pomiędzy 3,3 a 3,55 ppm, pochodzącymi najprawdopodobniej od glukozy, tauryny oraz mioinozytolu (mI). Grupa nowotworów złośliwych G-IV nie wykazuje dodatniej korelacji z żadnymi neurometabolitami dla drugiej składowej ukrytej LC2.



Rysunek 7.23. Wykresy współrzędnych czynnikowych przypadków $t[1]/t[2]$ (a, c) oraz wag $w^*[1]/w^*[2]$ (b, d) modeli OSC PLS-DA-13-GR (a - b) i OSC PLS-DA-13-REF (c - d).

Oceny istotności statystycznej rozróżnienia widm na wykresach wartości czynnikowych przypadków grupujących widma z uwzględnieniem stopnia złośliwości nowotworu (rysunek 7.23 a i c) dokonano na podstawie testów K-W. Tabela 7.42 przedstawia otrzymane wyniki, a wartości istotne statystycznie są oznaczone kolorem czerwonym. Hipoteza zerowa – o braku istotnego rozróżnienia pomiędzy analizowanymi grupami na wykresach wartości czynnikowych przypadków – może zostać odrzucona (przy poziomie istotności $\alpha = 0.05$) dla każdego z analizowanych wykresów.

Dla modelu OSC PLS-DA-13-GR istotne statystycznie różnice są widoczne pomiędzy:

- G-I i G-II oraz G-II i G-IV (względem pierwszej składowej ukrytej LC1),
- wszystkimi grupami (względem drugiej składowej ukrytej LC2).

Natomiast dla modelu OSC PLS-DA-13-REF istotne statystycznie różnice są widoczne pomiędzy:

- G-I i pozostałymi grupami (względem pierwszej składowej ukrytej LC1),
- G-VI i pozostałymi grupami (względem drugiej składowej ukrytej LC2).

Tabela 7.42. Wyniki testów Kruskala-Wallisa dla rozkładów wartości współrzędnych czynnikowych przypadków otrzymanych w analizach uwzględniających stopień złośliwości nowotworu.

Model OSC PLS-DA-13-GR				Model OSC PLS-DA-13-REF			
1 LC				1 LC			
Test K-W: $H_2 = 51,4951$, $p = 0,0000$				Test K-W: $H_2 = 22,88$, $p = 0,0000$			
	G-I	G-II	G-IV		G-I	G-II	G-IV
G-I		0,0000	0,668	G-I		0,0000	0,0005
G-II	0,0000		0,0000	G-II	0,0000		0,093
G-IV	0,0668	0,0000		G-IV	0,0005	0,093	
2 LC				2 LC			
Test K-W: $H_2 = 26,636$, $p = 0,0000$				Test K-W: $H_2 = 41,0784$, $p = 0,0000$			
	G-I	G-II	G-IV		G-I	G-II	G-IV
G-I		0,02	0,0000	G-I		0,3086	0,0414
G-II	0,02		0,0055	G-II	0,3086		0,0000
G-IV	0,0000	0,0055		G-IV	0,0414	0,0000	

H_n – wartość statystyki testu K-W przybliżona rozkładem χ^2 , n – liczba stopni swobody.

7.2.5.7 Rozróżnienie widm ^1H MRS ze względu na lokalizacje obszaru pomiarowego

Wyniki otrzymane w powyższych analizach (podpunkty 7.2.5.1 – 7.2.5.6) wskazują nie tylko na zróżnicowanie profili metabolicznych w zależności od czynników takich jak typ i stopień złośliwości guza, zastosowanie leczenia czy stan guza w badaniach kontrolnych, ale wskazują również na wpływ lokalizacji obszaru pomiarowego, z którego zbierane jest widmo, na rodzaj i intensywność rejestrowanych zaburzeń.

W ostatnim etapie analiz OSC PLS-DA przeprowadzone zostało porównanie profili metabolicznych obu lokalizacji – profilu charakterystycznego dla granicy guza/łoża pooperacyjnej oraz profilu rejestrowanego w obszarze referencyjnym. Macierz \mathbf{X} (170×928) została poddana filtrowaniu OSC i po odjęciu 4 komponentów OSC (tabela 7.43) wykorzystana do zbudowania modelu OSC PLS-DA-14, którego charakterystyka jest przedstawiona w tabeli 7.44.

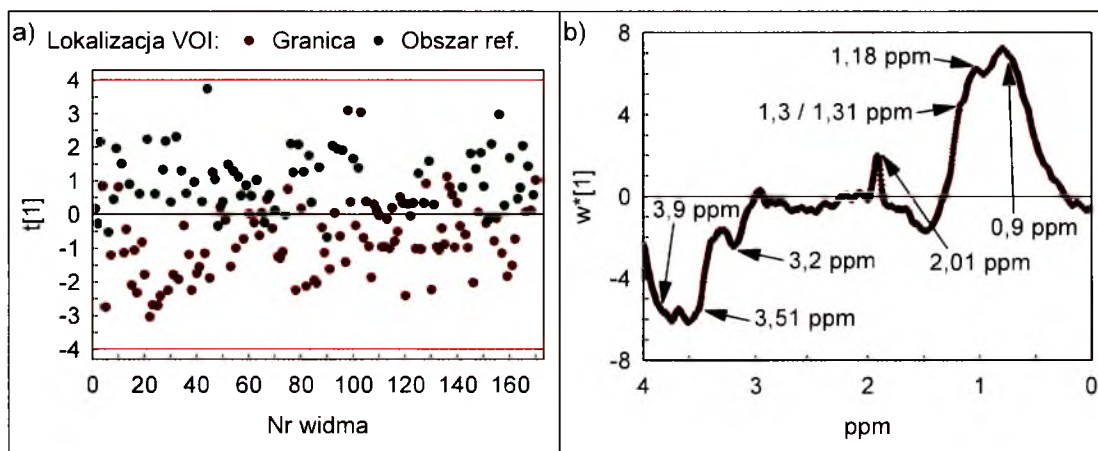
Tabela 7.43. Usuwanie z modelu OSC PLS-DA-14 informacji niezwiązanej z lokalizacją obszaru pomiarowego.

OSC	Deg. [°]	R ² OSC [%]	Warunek istotności komponentu OSC
1	89,92	32,6	$R^2\text{OSC} [\%] > 2/\min(m,n) \cdot 100$ $2/170 \cdot 100 = 1,2$
2	89,96	19,6	
3	89,94	10,1	
4	89,90	4,9	
5	89,68	0,8	

Deg. – kąt pomiędzy kolejnymi wektorami t_{osc} i macierzą Y .

Tabela 7.44. Charakterystyka jakości modelu OSC PLS-DA-14.

LC	λ	R ² X [%]	R ² X (cum) [%]	R ² Y [%]	R ² Y (cum) [%]	Q ² [%]	Q ² (cum) [%]
1	42,2	24,8	24,8	50,5	50,5	47	47
2	23,6	13,9	38,7	0,5	51	-14,1	33,1



Rysunek 7.24. Wykresy współrzędnych czynnikowych przypadków (a) oraz wag (b) modelu OSC PLS-DA-14.

Rysunek 7.24 przedstawia wykresy współrzędnych czynnikowych przypadków oraz wag otrzymane dla modelu OSC PLS-DA-14. Wyraźne grupowanie widm względem lokalizacji obszaru pomiarowego (rysunek 7.24 a) pozwala na identyfikację różnic w profilach metabolicznych grup (rysunek 7.24 b). W profilu metabolicznym charakterystycznym dla obszaru referencyjnego przeważają sygnały pochodzenia lipidowego (0,9 i 1,3 ppm) i mleczanowego (1,31 ppm). Nie można wykluczyć, że swój wkład do tego zakresu spektralnego wnoszą także makromolekuły białkowe.

Natomiast na granicy guza lub łoża pooperacyjnej zdecydowanie podwyższone są sygnały w zakresie 3,5 – 3,9 ppm odpowiadające mioinozytolowi, mI, glutaminie i glutaminianowi, Glx, oraz częściowo kreatynie/fosfokreatynie, tCr. Niewielkie różnice są również widoczne w stężeniach związków cholinowych, tCho, oraz NAA. Przy czym, zgodnie z oczekiwaniami, wyższe stężenia tCho (odzwierciedlające procesy demielinizacji i/lub proliferacji w komórkach nowotworowych) są widoczne na granicy guza/łoża pooperacyjnej natomiast wzrost NAA (uznawanego za marker gęstości i prawidłowego funkcjonowania neuronów) jest obserwowany w obszarze referencyjnym. [de Graaf 2007].

Tabela 7.45. Wyniki testu t-Studenta dla rozkładów wartości współrzędnych czynnikowych otrzymanych w analizach uwzględniających lokalizację obszaru pomiarowego.

Model OSC PLS-DA-14
Test t-Studenta: $t = 13,0924$, $p = 0,0000$

Oceny istotności statystycznej rozróżnienia widm na wykresach wartości czynnikowych przypadków ze względu na lokalizację obszaru pomiarowego (rysunek 7.24 a) dokonano na podstawie testu t-Studenta. Tabela 7.45 przedstawia otrzymane wyniki, a wartości istotne statystycznie są oznaczone kolorem czerwonym. Hipoteza zerowa – o braku istotnego rozróżnienia pomiędzy analizowanymi grupami na wykresach wartości czynnikowych przypadków – może zostać odrzucona (przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$).

7.2.5.8 Dyskusja

Choć analizy PLS-DA przeprowadzone na pełnym zestawie widm – bez podziału względem lokalizacji obszaru pomiarowego – dostarczyły wyników mających spore poparcie w piśmiennictwie, to uwzględnienie lokalizacji obszaru pomiarowego pozwala nie tylko na scharakteryzowanie zaburzeń metabolicznych w obu lokalizacjach i porównanie stopnia ich nasilenia, ale również daje potencjalne możliwości optymalizacji wyboru lokalizacji obszaru pomiarowego pod kątem skutecznego przyporządkowywania widm do określonej grupy.

Parametry R^2Y oraz Q^2 , opisujące odpowiednio całkowitą wyjaśnioną wariancję związaną z przynależnością widm do danej klasy oraz zdolność przewidywania klas widm nie biorących udziału w budowaniu modelu, mają istotne znaczenie w metodzie

PLS-DA, ponieważ odzwierciedlają jakość grupowania widm na wykresach wartości czynnikowych. Porównanie wartości tych parametrów oraz otrzymanych wykresów wartości czynnikowych dla obu lokalizacji obszaru pomiarowego pokazuje, że w przypadku widm pochodzących z okolic guza/łoży pooperacyjnej metoda OSC + PLS-DA dostarcza lepszych wyników jedynie dla analiz prowadzonych pod kątem histopatologicznym (OSC PLS-DA-8-GR) i określenia wpływu resekcji guza (OSC PLS-DA-11-GR) – w tych przypadkach wartości parametrów R^2Y i Q^2 są większe o 9,5 i 16,8 oraz o 1,9 i 19,5%, niż odpowiednie wartości w modelach analizujących widma zarejestrowane z obszaru referencyjnego OSC PLS-DA-8-REF i OSC PLS-DA-11-REF (tabele 7.31 i 7.37).

W przypadku analiz mających na celu rozróżnienie wczesnych i późnych powikłań po radioterapii (OSC PLS-DA-10-GR i OSC PLS-DA-10-REF) oraz określenie wpływu chemioterapii (OSC PLS-DA-12-GR i OSC PLS-DA-12-REF), separacja grup widm na wykresach czynnikowych przypadków jest wyraźniejsza dla widm pochodzących z obszaru referencyjnego. Znajduje to odzwierciedlenie w wartościach parametrów R^2Y i Q^2 , których wartości są większe odpowiednio o 31,3 i 50,7 (RT) oraz o 6,5 i 16,4% (CHT) od odpowiadających im wartości otrzymanych w modelach analizujących widma zarejestrowane na granicy guza/łoży pooperacyjnej (tabele 7.34 i 7.38).

Obszar referencyjny jest także lepszym punktem wyjścia do analiz widm 1H MRS pod kątem przynależności do grup wyznaczonych na podstawie wyników badań kontrolnych. Jedynie w obszarze referencyjnym model OSC PLS-DA (OSC PLS-DA-9-REF) był w stanie odseparować widma wchodzące w skład grup wznowy i progresji od pozostałych grup (BCG i stagnacja). Wprawdzie wartość parametru Q^2 jest tu o 1,2% mniejsza, niż w modelu OSC PLS-DA-9-GR analizującym widma pochodzące z granicy guza/łoży pooperacyjnej, to jednak wartość R^2Y jest większa o 9,8%, niż dla obszaru ulokowanego w okolicy guza/łoży pooperacyjnej (tabela 7.33).

Przy ocenie stopnia złośliwości nowotworu wpływ lokalizacji jest zdecydowanie słabszy. Model OSC PLS-DA-13-REF, analizujący widma z obszaru referencyjnego, ma wartość parametru R^2Y większą o 14,1 % od modelu OSC PLS-DA-13-GR (a więc uwzględniającego widma z pogranicza łoży/guza), który z kolei ma o 4,9% większą wartość parametru Q^2 (tabela 7.41). Pomimo tych różnic w obu modelach uzyskuje się wyraźną separację poszczególnych klas przypadków na wykresach współrzędnych czynnikowych przypadków (rysunek 7.23), co potwierdza test Kruskala-Wallisa (tabela 7.42). Jednakże profile metaboliczne wyznaczone na podstawie obu modeli różnią się, co

może wynikać z tego, że stopień złośliwości nowotworu jest bezpośrednio związany z jego typem histopatologicznym, a lepsze rozróżnienie poszczególnych typów guza uzyskano na granicy guza/łoży (rysunek 7.17). Z drugiej strony w obszarze referencyjnym uzyskano rozróżnienie wznowy i progresji nowotworu (rysunek 7.18), które mogą odzwierciedlać proces zezłośliwienia się nowotworu. Z tego powodu celowym wydaje się analizowanie widm ^1H MRS z obu lokalizacji obszaru pomiarowego.

Widma rejestrowane w okolicy guza/łoży pooperacyjnej są zazwyczaj gorszej jakości od tych pochodzących z obszaru referencyjnego, co wynika głównie z niejednorodności tkankowej, w tym z bezpośredniego sąsiedztwa badanej tkanki z obszarem zmiany patologicznej [Oh 2005] oraz skutków nasilonego lokalnie leczenia przeciwnowotworowego [Tanaka 1995, Gong 2004]. Z drugiej strony to właśnie te dwa czynniki wpływają na wyraźną poprawę jakości modeli analizujących widma z tej lokalizacji pod kątem przynależności do danej grupy histopatologicznej oraz przebytej lub nie resekcji guza.

Profil metaboliczny uzyskany z okolicy guza/łoży pooperacyjnej w analizie prowadzonej pod kątem rozróżniania histopatologicznego jest niemal identyczny z profilem otrzymanym dla przypadku bez uwzględniania lokalizacji obszaru pomiarowego (rysunki 7.17 (a, b) i 7.7). Może to być odzwierciedleniem intensywności oddziaływania procesu nowotworowego na metabolizm mózdzku. Ponadto, dla modeli OSC PLS-DA-8-GR i OSC PLS-DA-8-REF można zaobserwować wzdłuż pierwszej składowej ukrytej, LC1, podobne trendy: wyraźnie podwyższone i obniżone sygnały z tych samych zakresów spektralnych (rysunek 7.17). W modelach OSC PLS-DA-8-GR i OSC PLS-DA-8-REF zakres spektralny odpowiadający sygnałom Lip, kojarzony z przebiegiem procesów bezpośrednio poprzedzających powstanie tkanki martwiczej [Negendank 1996], jest odpowiedzialny za zdecydowane odseparowanie grupy GBM (glioblastoma). Jak pokazują wyniki badań zmian popromiennych w mózgowiu, intensywności integralne sygnałów Lip mogą rosnać w efekcie radioterapii, również w obszarach małej dawki pochłoniętej [Rutkowski 2003]. Tym więc można tłumaczyć ich wysoki poziom w obszarze referencyjnym. Z drugiej strony, stężenia tCho i mI, których wzrost pozwalał na rozróżnienie grupy astrocytomy (ASTR) w okolicy guza/łoży (rysunek 7.17 a, b), w obszarze referencyjnym na wykresie wag w^* (rysunek 7.17d) wykazują znikomą istotność w porównaniu do sygnałów Lip.

Profile metaboliczne odzwierciedlające efekty post-operacyjne (resekcja guza) zależą od lokalizacji obszaru pomiarowego (rysunek 7.21). U pacjentów, u których

przeprowadzono całkowitą lub częściową resekcję guza, w okolicy łoża pooperacyjnej dominuje pasmo Lip oraz Lac, z maksimum wypadającym przy 1,15 ppm, przy czym jego zakres ulega przesunięciu w kierunku niższych pól (wyższych wartości ppm) w obszarze referencyjnym, gdzie maksimum obserwuje się przy 1,3 ppm. Może to wskazywać, że w obu obszarach proporcja między grupami CH_3 i CH_2 dającymi wkład do tej części widma różni się, lub że w obszarze referencyjnym wzrasta stężenie Lac w porównaniu do stężenia wolnych związków lipidowych – a to z kolei może wynikać z innych procesów operujących w obszarze umiejscowionym na pograniczu łoża pooperacyjnej lub guza i w obszarze odległym. Obecność sygnałów Lip i Lac w okolicy łoża pooperacyjnej i obecność samego mleczanu w obszarach oddalonych od łoża, które nie wykazują cech patologicznych w badaniu obrazowym, raportuje Li [Li 2005]. Sugeruje on, że przyczyną może być zarówno infiltracja komórek nowotworowych do przyległych tkanek, jak i podwyższona aktywność glikolityczna (spalania glukozy) makrofagów. Inna obserwacja wskazuje, że u pacjentów u których po przebytej resekcji zastosowano radioterapię, stężenia zarówno Lip, jak i Lac były wyższe w całym napromienionym obszarze (łoża pooperacyjna ze stosownym marginesem), niż stężenia tych metabolitów oszacowane bezpośrednio po operacji a przed rozpoczęciem RT [Rutkowski 2003].

W okolicy guza – u pacjentów, którzy nie byli operowani – zaobserwowano podwyższone stężenia tCho (odzwierciedlające m.in. wzmożoną proliferację komórek nowotworowych i/lub pojawienie się procesów rozpadu błon komórkowych) oraz ml (mogące mieć związek z uszkodzeniem błon komórkowych). Jest to dodatkowa cecha dyskryminacyjna różnicująca profile metaboliczne pacjentów poddanych operacji i tych, którzy nie byli operowani. Stężenia te u osób operowanych i nieoperowanych nie różnią się w przypadku obszaru referencyjnego.

Obserwacja ta potwierdza wniosek wynikający z analizy widm uwzględniającej dane histopatologiczne, że metaboliczne oddziaływanie rozrastających się komórek nowotworowych ma charakter lokalny, podczas gdy metaboliczne skutki zabiegu operacyjnego są globalne, które dodatkowo mogą ulegać wzmocnieniu przez zastosowanie radioterapii.

Podstawowym czynnikiem ograniczającym zakres zastosowanej terapii przeciwnowotworowej jest stopień uszkodzenia zdrowej tkanki. Zadaniem radioterapii jest zniszczenie DNA komórek nowotworowych i doprowadzenie do ich śmierci. Przeważnie odbywa się to w procesie pośrednim, opartym na radiolizie cząsteczek wody

obecnych w komórce. W efekcie powstaje bardzo aktywny rodnik hydroksylowy, który reagując z cząsteczkami deoksyrybozy wchodzącymi w skład DNA może wywoływać pęknięcia nici DNA [Roszkowski 2005]. Choć większość typów komórek nowotworowych jest bardziej podatna na działanie promieniowania jonizującego niż komórki zdrowe, to te ostatnie mogą również ulec uszkodzeniu lub nawet całkowitemu zniszczeniu. Uszkodzenia popromienne OUN wywoływane są przez dwa główne mechanizmy, z których ważniejszy jest tzw. mechanizm naczyniowy. Działa on tak, że w pierwszej kolejności uszkodzeniu ulegają naczynia włosowate – co prowadzi do zmian w przepuszczalności bariery krew-mózg, powodując w następstwie obrzęk, niedotlenienie oraz w końcowym etapie martwicę. Drugi mechanizm opisuje apoptyczną śmierć oligodendrocytów spowodowaną przez bezpośrednie działanie promieniowania jonizującego. O ile w przypadku niewielkich dawek pochłoniętych zdecydowana większość uszkodzeń jest naprawialna, to mogą również wystąpić uszkodzenia poważne, prowadzące do późnych, nieodwracalnych zmian popromiennych. Jak przedstawiono w tabeli 7.1 pacjenci byli napromieniani z wykorzystaniem dwóch technik. W pierwszej napromieniany był cały mózg ze zwiększoną dawką w tylnej jamie czaszki, w drugiej napromienianie obejmowało jedynie obszar guza/łoży pooperacyjnej wraz z pewnym marginesem przylegającej tkanki. Ponieważ nawet podczas terapii lokalnej nie jest możliwe całkowite osłonięcie tkanki zdrowej, pewien procent dawki całkowitej zostaje pochłonięty również w obszarze referencyjnym.

Profile metaboliczne wczesnych i późnych powikłań po RT wykazują duże podobieństwo w obu badanych lokalizacjach, jednak zdecydowanie lepsza separacja grup została otrzymana dla obszaru referencyjnego (rysunki 7.19 i 7.20). Jest to zapewne efekt słabszego oddziaływania nowotworu na metabolizm oraz pośredni jedynie wpływ zabiegu operacyjnego w obszarze referencyjnym, co ułatwia wyodrębnienie zmian metabolicznych charakterystycznych dla działania promieniowania jonizującego.

W obu lokalizacjach zaobserwowano wyraźnie podwyższone sygnały Lip i/lub Lac charakterystyczne dla późnych zmian popromiennych [Tzika 2002b, Kamada 1997] (rysunek 7.19), które są głównym czynnikiem rozróżniającym pomiędzy wczesnymi a późnymi powikłaniami po radioterapii. Na granicy guza/łoży pooperacyjnej, we wczesnej fazie leczenia, istotny wkład do obserwowanego profilu metabolicznego może pochodzić od metabolizmu komórek nowotworowych lub/oraz zaburzeń spowodowanych resekcją. Te efekty prowadzą do podwyższenia sygnałów lipidowych, co w konsekwencji może

być przyczyną słabszego rozróżnienia pomiędzy wczesnymi a późnymi powikłaniami w tym obszarze.

Również rozróżnienie widm pod kątem zastosowanej lub nie chemioterapii, przedstawione na rysunku 7.22 (a i c), jest zdecydowanie dokładniejsze dla obszaru referencyjnego. Leki cytostatyczne podawane podczas chemioterapii mają za zadanie niszczyć szybko dzielące się komórki nowotworowe, jednakże uszkadzają też dzielące się komórki zdrowe, co prowadzi do szeregu powikłań obserwowanych również w zdrowej tkance mózgu [Chu 2003, Prassopoulos 1997, Ruben 2006], które mogą przyjmować długotrwałą formę. Ze względu na obecność bariery krew-mózg, której zadaniem jest ochrona mózgu przed szkodliwymi substancjami znajdującymi się w krwiobiegu, niektóre ze stosowanych leków cytostatycznych wymagają uprzedniego zwiększenia przepuszczalności tej bariery. Może to spowodować przedostanie się przez barierę również innych związków, których obecność może się ujawnić w badaniu MRS. Poważne uszkodzenie bariery krew-mózg prowadzi m.in. do pojawienia się sygnałów lipidowych [Dezortova 1999, Murphy 2003]. Ponadto zastosowanie chemioterapii – jako leczenia wspomagającego dla radioterapii – zwiększa intensywność skutków ubocznych terapii przeciwnowotworowej oraz jest wymieniane wśród czynników zwiększających ryzyko wystąpienia martwicy popromiennej [Ruben 2006]. Profile metaboliczne zarejestrowane w okolicy guza/łoży pooperacyjnej i w obszarze referencyjnym różnią się (rysunek 7.22). O ile w obu lokalizacjach obszar skorelowany dodatnio z chemioterapią wypada mniej więcej w zakresie 1,3 – 1,6 ppm, to na granicy guza/łoży pooperacyjnej dodatkowo staje się widoczny zakres spektralny pomiędzy 0,2 a 0,95 ppm, o nieco słabszej intensywności. Obserwuje się również podwyższenie intensywności integralnej sygnału mI (3,52 ppm), przy czym w obszarze referencyjnym podwyższone sygnały w przedziale 0,2 – 0,95 ppm są charakterystyczne dla pacjentów bez chemioterapii. Obecność sygnałów lipidowych na granicy guza/łoży pooperacyjnej może być wywołana przez dodatkowe czynniki, na przykład związane z resekcją guza czy radioterapią (jako wynik pochłonięcia większej dawki promieniowania jonizującego), a wzrost stężeń mI prawdopodobnie odzwierciedla gliozę będącą jednym z efektów uszkodzenia bariery krew-mózg, w wyniku którego z krwi przez barierę przedostają się toksyczne dla astrocytów białka osocza (głównie albuminy). Natomiast pożądaný efekt chemioterapii: wyraźne obniżenie intensywności integralnej sygnału tCho [Chu 2003] odzwierciedlające spadek stężenia związków cholinowych jako efekt spowolnienia proliferacji komórek, jest wyraźnie widoczne w okolicy guza/łoży pooperacyjnej.

Co zaskakujące, analiza widm pod kątem przynależności do danej grupy kontrolnej dostarczyła bardziej precyzyjnych wyników dla obszaru referencyjnego niż dla lokalizacji w pobliżu guza/łoży pooperacyjnej. Na rysunku 7.18 widoczne jest – dla obu lokalizacji – wyraźne odseparowanie grupy guza stabilnego (nowotworu lub jego pozostałości o zahamowanym wzroście, ale jednocześnie bez widocznego zmniejszania objętości), jednakże intensywność sygnałów odpowiedzialnych za powyższą separację, zgodnie z wynikami analizy prowadzonej pod kątem rozróżniania histopatologicznego (rysunek 7.17), jest zdecydowanie niższa w obszarze referencyjnym. Z drugiej strony to właśnie w obszarze referencyjnym możliwe jest wyodrębnienie grup wznowy i progresji (rysunek 7.18), a właśnie ta zdolność do odseparowania tych grup od grup guza stabilnego oraz braku cech guza jest szczególnie istotna z klinicznego punktu widzenia. Powodem zaistniałej sytuacji może być częstsze występowanie wznowy nowotworu w miejscu oddalonym od jego pierwotnej lokalizacji, przy czym spektroskopia MRS pozwala zaobserwować procesy bezpośrednio poprzedzające wznowę i/lub progresję nowotworu zanim ujawnią się one w badaniu obrazowym. Rozróżnienie pomiędzy sygnałami Lip przy 0,9 ppm i 1,3 ppm dające możliwość rozpoznania wznowy nowotworu zostało udokumentowane przez Matulewicza [Matulewicz 2006]. Jednak autor ten analizował widma ^1H MRS uzyskane od grupy pacjentów wyłącznie ze wznową nowotworu i porównywał stosunek grup CH_2/CH_3 w obszarze referencyjnym i na granicy guza/łoży. W powyższej pracy pacjenci ze wznową nowotworu stanowią jedynie 5% z całej grupy.

Wskazanie preferowanej lokalizacji obszaru pomiarowego w celu oceny stopnia złośliwości nowotworu na podstawie jedynie porównania parametrów R^2Y i Q^2 nie jest oczywiste (tabela 7.41). Dla obu lokalizacji obszaru pomiarowego uzyskano bardzo wyraźne rozróżnienie poszczególnych grup (rysunek 7.23 a i c), jednak w zależności od lokalizacji obszaru pomiarowego różne zakresy spektralne miały wkład w separację widm (rysunek 7.23). Zgodnie z oczekiwaniami model uzyskany dla danych pochodzących z okolicy guza/łoży pozwala zdecydowanie lepiej skojarzyć profile metaboliczne z typem oraz stopniem złośliwości nowotworu, natomiast w przypadku obszaru referencyjnego jest to utrudnione ze względu na efekt uśrednienia objętościowego (obecność większej objętości tkanki zdrowej). Model OSC PLS-DA-13-GR prawidłowo wskazuje na dodatnią korelację sygnałów Lip przy 0,9 ppm z grupą nowotworów złośliwych G-IV, co najprawdopodobniej odzwierciedla obecność tkanki martwiczej oraz na dodatnią korelację sygnałów tCho (3,2 ppm) i mI (3,56 i 3,62 ppm) z grupą G-II, która złożona jest

głównie z przypadków astrocytomy o niskim stopniu złośliwości [Castillo 2000, Callot 2008].

Dla obu lokalizacji obszaru pomiarowego bardzo wyraźnie wyodrębniona została grupa G-I (rysunek 7.23 a i c), czyli nowotwory łagodne (grupę tą tworzą jedynie przypadki ze zdiagnozowaną hemangioblastomą (HM)), charakteryzujące się wysokim zróżnicowaniem i brakiem lub znikomą infiltracją do przylegających tkanek. W obszarze referencyjnym grupy HM dominują sygnały lipidowe w zakresie 0,84 – 1,1 ppm (rysunek 7.23 c i d). Obecność sygnałów Lip zaobserwował Isobe [Isobe 2010] w tkance guza, jednakże w obszarze referencyjnym sygnały te muszą być skutkiem terapii przeciwnowotworowej. Natomiast na granicy guza/łoży pooperacyjnej hemangioblastomie odpowiadają podwyższone sygnały pochodzące od Ala, lizyny, GABA i Ace dające sygnały rezonansowe w paśmie pomiędzy 1,48 a 1,95 ppm, z maksimum przypadającym na 1,7 ppm (rysunek 7.23 a i b), co pozostaje w zgodzie z profilem metabolicznym dostarczonym przez model OSC PLS-DA-2 (rysunek 7.8) rozróżniającym widma ^1H MRS ze względu na dane histopatologiczne.

Do interesujących wniosków prowadzi porównanie wyników dostarczonych przez modele OSC PLS-DA-13-GR i OSC PLS-DA-13-REF z wynikami dostarczonymi przez model OSC PLS-DA-7 analizujący widma ^1H MRS z obu lokalizacji obszaru pomiarowego (granicy guza/łoży pooperacyjnej oraz obszaru referencyjnego). Dwa pierwsze modele bardzo dobrze poradziły sobie z rozróżnieniem poszczególnych grup, wskazując jednak na różne cechy dyskryminacyjne (rysunek 7.23), co w efekcie było przyczyną znacznego pogorszenia grupowania widm zebranych z obu lokalizacji (model OSC PLS-DA-7, rysunek 7.16). Ten przykład pokazuje, jak istotny jest odpowiedni dobór danych wejściowych do analizy.

W ramach podsumowania omówionych powyżej analiz metodą PLS-DA dokonano bezpośredniego porównania widm z okolicy guza/łoży pooperacyjnej i obszaru referencyjnego. W rezultacie otrzymano model OSC PLS-DA-14, który wyraźnie rozdzielił widma pochodzące z obu lokalizacji obszaru pomiarowego (rysunek 7.24), wskazując równocześnie na znaczny wzrost sygnałów mI (3,52 i 3,61 ppm), Glx (3,75 – 3,76 ppm) oraz – w mniejszym stopniu – związków cholinowych (3,2 ppm). Są to cechy charakterystyczne dla widm zarejestrowanych na granicy guza/łoży pooperacyjnej. Natomiast w obszarze referencyjnym zaobserwowano wyraźnie podwyższone sygnały

Lip i/lub Lac (0,9 – 1,31 ppm) oraz zdecydowanie słabszą, dodatnią korelację z sygnałem NAA.

Otrzymane profile metaboliczne wydają się być efektem skumulowanego wpływu wszystkich analizowanych czynników (terapeutycznych, jak i patologicznych) na tkankę mózdzku w danej lokalizacji. Co zaskakujące, sygnały Lip i Lac, zazwyczaj traktowane jako markery poważnych i często nieodwracalnych zmian destrukcyjnych w tkance nerwowej, są szczególnie wyraźne w tkance teoretycznie zdrowej, co najprawdopodobniej stanowi efekt terapii przeciwnowotworowej.

7.2.6 Klasyfikacja widm ^1H MRS metodą sieci neuronowych

Ponieważ zdolność do nauki dla perceptronu wielowarstwowego spada wraz ze wzrostem liczby klas przypadków, dla trzech analiz zminimalizowano liczbę klas poprzez:

- połączenie grup hemangioblastomy (HM), glioblastomy (GBM) i ependymomy (EP) w jedną grupę „pozostałe”,
- połączenie grup wznowy (Wznowa) i progresji (Progresja) guza w jedną grupę „wzno-prog”,
- połączenie grup G-I i G-II określające stopień złośliwości nowotworu w grupę „G: I-II”.

Dodatkowo, dzięki temu zabiegowi wyrównano częściowo liczebności poszczególnych klas.

Ponieważ proces uczenia przebiega tym efektywniej im więcej jest przypadków uczących, dlatego też w niniejszej pracy zrezygnowano z podziału przypadków uczących względem lokalizacji GR i REF, jak miało to miejsce dla analiz PLS-DA.

Podział zbiorów uczących na wewnętrzne podzbiory oraz liczebności poszczególnych zbiorów testowych przedstawia tabela 7.46.

Tabela 7.46. Podział przypadków zbioru uczącego na wewnętrzne podzbiory uczące (U), walidacyjne (W) i testowe (T) z uwzględnieniem liczebności zewnętrznych zbiorów testowych.

	Zbiór uczący				Zewnętrzny zbiór testowy T_{zew}
	Wszystkie	U	W	T	
Typ guza	100	74	14	12	39 (7 + 20 + 12)
Badania kontrolne	137	104	18	15	29 (5 + 8 + 16)
Powikłania po RT	139	102	20	17	25 (20 + 5)
Resekcja guza	144	105	21	18	26 (20 + 6)
Chemioterapia	147	110	20	17	23 (12 + 11)
Stopień złośliwości guza	118	88	16	14	21 (8 + 13)

W nawiasach podano liczebność poszczególnych klas w zewnętrznym zbiorze testowym.

Dobór algorytmu uczącego oraz parametrów uczenia sieci odbywał się metodą prób i błędów. Dla każdego ustawienia uczono 100 sieci MLP, z których wybierano jedną lub kilka z najmniejszym błędem klasyfikacji na zbiorze testowym. Po zmianie wartości któregośkolwiek z parametrów uczono kolejnych 100 sieci. Procedura była powtarzana do wyczerpania całego zakresu wartości dostępnego dla każdego z parametrów (kryterium przyjmowania wartości granicznych ustalane było przez autora, a więc nie korzystano z wartości max/min dostępnych w oprogramowaniu STATISTICA 7.1). Następnie,

poprzez bezpośrednie porównanie kilkuset najlepszych sieci wybrane zostały parametry uczenia gwarantujące największą stabilność algorytmu uczenia oraz dające dobre właściwości klasyfikacyjne sieci. W tabeli 7.47 umieszczono zestawienie stałych dla każdej sieci parametrów uczenia.

Tabela 7.47. Zestawienie stałych parametrów uczenia perceptronów wielowarstwowych.

Funkcja błędu klasyfikacji	NRMSE		
Konwersja zmiennych wejściowych	Brak		
Funkcje aktywacji neuronów	Wejściowych	Ukrytych	Wyjściowych
	Liniowa	Hiperboliczna	Logistyczna
Inicjalizacja wag	Losowa równomierna		
Algorytm uczenia	Wsteczna propagacja błędu		
Liczba epok	10000		
Szybkość uczenia	Faza początkowa		Faza końcowa
	0,05		0,01
Bezwładność	Faza początkowa		Faza końcowa
	0,4		0,2
Warunek zatrzymania uczenia	Przywróć najlepszą sieć		
Bias	0,1		
Mieszanie kolejności przypadków uczących w każdej epoce	Tak		

Warunek zatrzymania uczenia określa, w którym momencie sieć ma przerwać uczenie. Podana wartość *Przywróć najlepszą sieć* oznacza, że po każdej epoce uczenia, zapamiętane zostają wszystkie współczynniki wagowe, a po wykonaniu zadanej liczby epok uczenia przywracana jest sieć o najlepszej jakości, przy czym może to być sieć nauczona w pierwszych epokach uczenia. Ta metoda jest swoistym zabezpieczeniem przed rozbieżnością algorytmu uczącego.

Po wybraniu optymalnego ustawienia procesu uczenia przystąpiono do właściwego uczenia sieci modyfikując jedynie strukturę sieci w zależności od liczby zmiennych uczących. Ponadto, analogicznie jak w przypadku poszukiwania optymalnych parametrów uczenia sieci, również podczas właściwego procesu uczenia MLP jednorazowo uczono 100 sieci, pozwalając każdorazowo programowi STATISTICA 7.1 na tworzenie nowych podzbiorów uczących, walidacyjnych i testowych wyodrębnionych ze zbioru uczącego, przy czym liczebność tych podzbiorów była ustalona (tabela 7.45) i stała dla każdego ze zbiorów uczących. Ten krok pozwolił na dodatkową optymalizację podziału przypadków uczących na podzbiory U, W i T dając tym samym możliwość poprawy zdolności klasyfikacyjnych sieci.

Ze 100 nauczonych sieci wybierana była sieć o najlepszej zdolności klasyfikacyjnej na zewnętrznym zbiorze testowym, co było uwarunkowane spełnieniem dwóch założeń:

- wysoka procentowa wartość poprawnych klasyfikacji,
- zbliżone wartości poprawnych klasyfikacji dla poszczególnych klas.

Drugie założenie jest szczególnie istotne w przypadku znaczących różnic w liczebności poszczególnych klas, kiedy to sieć może wykazywać dobrą zdolność do klasyfikacji przypadków z klasy liczniejszej kosztem przypadków z klasy mniej licznej zachowując tym samym wysoką wartość ogólnej poprawnej klasyfikacji.

W niektórych przypadkach zdolność klasyfikacyjna sieci była zwiększana poprzez łączenie kilku najlepszych sieci w tzw. zespół sieci, gdzie wynik końcowy jest pewnym uśrednieniem wyników uzyskanych przez wchodzące w skład zespołu sieci. Topologia zespołu sieci jest przedstawiana w następujący sposób: $n:[x(y)]:m$, gdzie n i m to odpowiednio liczby neuronów wejściowych i wyjściowych, natomiast x jest liczbą sieci wchodzących w skład zespołu sieci a y określa liczbę neuronów w warstwie ukrytej tych sieci.

7.2.6.1 Klasyfikacja po redukcji wymiarów zmiennych wejściowych metodą PCA

Ze względu na osobne dobieranie zewnętrznych zbiorów testowych dla każdego zagadnienia klasyfikacyjnego, co w rezultacie doprowadziło do otrzymania sześciu różnych zbiorów uczących, konieczne było utworzenie sześciu osobnych modeli PCA w celu redukcji liczby zmiennych wejściowych. Wyniki tej operacji, dla poszczególnych zbiorów uczących, zostały umieszczone w tabeli 7.48.

Sieci MLP były uczone z wykorzystaniem wszystkich istotnych składowych głównych, następnie odrzucano ostatnią składową i uczono kolejne sieci aż do wyczerpania wszystkich składowych głównych. Tabele 7.49 – 7.54 zawierają charakterystyki najlepiej nauczonych sieci MLP, wraz z wynikami klasyfikacji przypadków testowych (T_{zew}) dla:

- grup histopatologicznych – tabela 7.49,
- grup wyznaczonych na podstawie badań kontrolnych – tabela 7.50,
- wczesnych i późnych powikłań po radioterapii (jako granicę pomiędzy obiema grupami przyjęto okres 90 dni) – tabela 7.51,
- odpowiedzi tkanki mózdzku na przeprowadzoną resekcję guza – tabela 7.52,
- odpowiedzi tkanki mózdzku na chemioterapię – tabela 7.53,
- stopnia złośliwości nowotworu – tabela 7.54.

Za ogólną wartość poprawnej klasyfikacji przyjęto średnią arytmetyczną poprawnych klasyfikacji dla poszczególnych klas.

Załączone w tabelach wykresy prezentują zmiany trendu poprawnych klasyfikacji (klasyfikacja ogólna oraz osobno dla każdej z klas) w zależności od skumulowanej procentowej wartości wariancji danych wejściowych wyjaśnionej przez zadaną liczbę składowych głównych (R^2X (cum)).

Parametry poprawnych klasyfikacji dla każdego z problemów klasyfikacyjnych zostały porównane tabeli 7.55.

Tabela 7.48. Wyniki redukcji wymiarów dla zbiorów uczących metodą PCA: liczba istotnych składowych głównych (PC) oraz procentowa wartość całkowitej wariancji wyjaśniona przez daną składową główną.

	Typ guza	Badania kontrolne	Powikłania po RT	Resekcja guza	Chemioterapia	Stopień złośliwości guza
PC	R^2X [%]	R^2X [%]	R^2X [%]	R^2X [%]	R^2X [%]	R^2X [%]
1	33,4	36,8	33,8	37,1	37,7	33,5
2	27,7	21	25,1	21,2	21,4	25,1
3	10,6	12,1	11	11,4	11,3	12,4
4	7,4	8,6	8,2	8,6	8,2	7,7
5	6,2	5,1	6	5,9	5,5	6,5
6	3,9	4,6	3,7	4,2	4,3	4,3
7	1,6	2,6	1,6	2,5	2,6	2,8
8	1	1,9	1	1,8	1,8	1,7
9	-	1	-	0,9	1	-
10	-	0,8	-	-	0,9	-

Za poziom istotności danej PC przyjęto $\lambda > 1$.

Tabela 7.49. Charakterystyka sieci oraz wynik klasyfikacji grup histopatologicznych.

Nr.	Topologia	Ilość PC	R^2X (cum) [%]	Błąd			Poprawna klasyfikacja [%]			
				U	W	T	MD	ASTR	Pozostałe	Ogółem
1	8:27:3	8	91,8	0,1	0,5	0,63	50	66,7	71,4	62,7
2	7:27:3	7	90,8	0,08	0,136	0,212	65	50	42,9	52,6
3	6:24:3	6	89,2	0,056	0,466	0,307	45	58,3	57,1	53,5
4	5:20:3	5	85,3	0,343	0,5	0,51	70	41,7	57,1	56,3
5	4:17:3	4	79,1	0,16	0,4	0,618	40	58,3	57,1	51,8
6	3:20:3	3	71,7	0,265	0,416	0,58	55	50	57,1	54
7	2:17:3	2	61,1	0,27	0,46	0,6	65	50	57,1	55,7
8	1:7:3	1	33,4	0,445	0,428	0,454	45	50	42,9	46

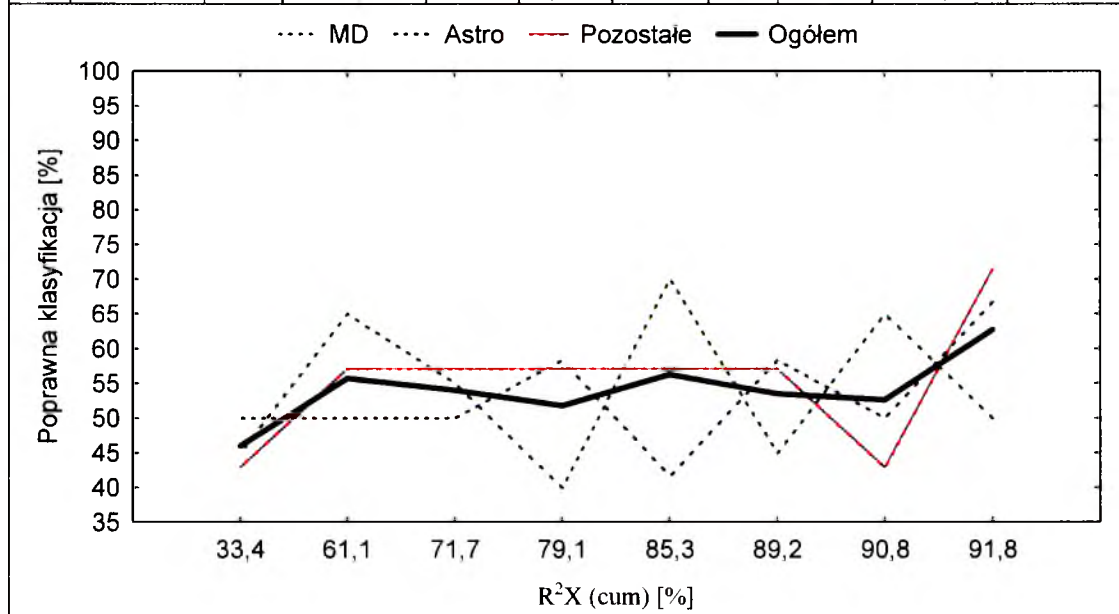


Tabela 7.50. Charakterystyka sieci oraz wynik klasyfikacji grup wyznaczonych na podstawie badań kontrolnych.

Nr.	Topologia	Ilość PC	R^2X (cum) [%]	Błąd			Poprawna klasyfikacja [%]			
				U	W	T	Wzno-prog	Stagn.	BCG	Ogółem
1	10:[7(34)]:3	10	94,5	0,22	0,466	0,48	80	100	81,3	87,1
2	9:[5(34)]:3	9	93,7	0,136	0,442	0,483	80	100	81,3	87,1
3	8:30:3	8	92,7	0,222	0,466	0,506	80	75	81,3	78,8
4	7:27:3	7	90,8	0,254	0,383	0,462	60	87,5	87,5	78,3
5	6:27:3	6	88,2	0,1	0,328	0,292	60	62,5	87,5	70
6	5:[3(25)]:3	5	83,6	0,31	0,5	0,35	80	100	87,5	89,2
7	4:[3(23)]:3	4	78,5	0,363	0,45	0,434	60	87,5	87,5	78,3
8	3:18:3	3	69,9	0,315	0,453	0,42	60	75	62,5	65,8
9	2:[3(20)]:3	2	57,8	0,364	0,416	0,46	60	87,5	75	74,2
10	1:6:3	1	36,8	0,427	0,374	0,417	20	75	87,5	60,8

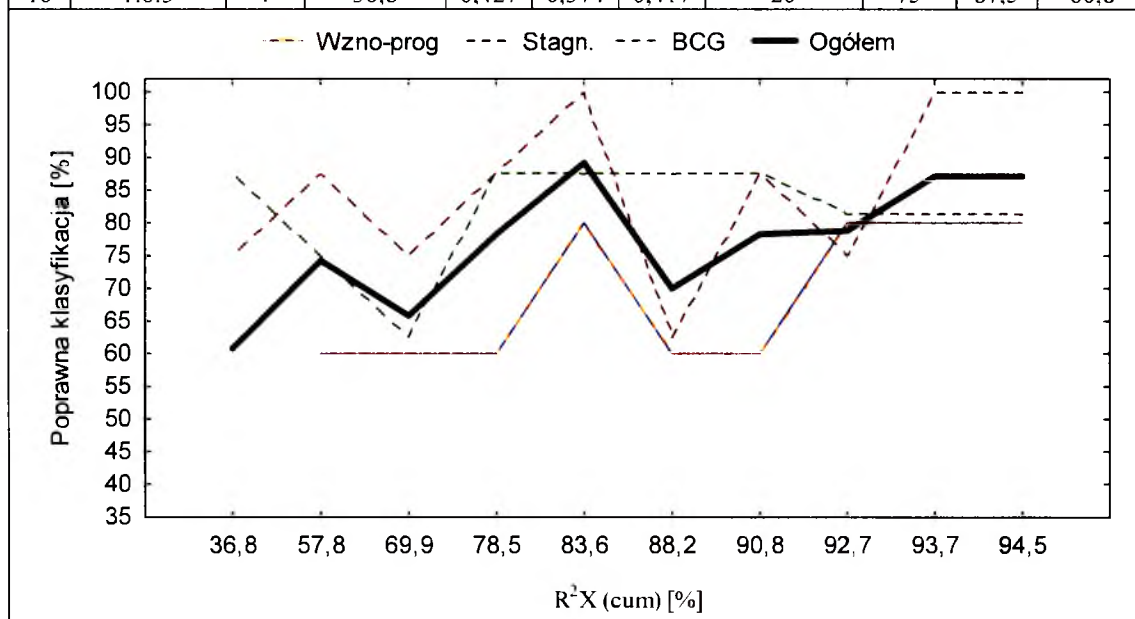


Tabela 7.51. Charakterystyka sieci oraz wynik klasyfikacji wczesnych i późnych powikłań po radioterapii.

Nr.	Topologia	Ilość PC	R^2X (cum) [%]	Błąd			Poprawna klasyfikacja [%]		
				U	W	T	Wczesne	Późne	Ogółem
1	8:[3(16)]:1	8	90,4	0,175	0,345	0,477	100	85	92,5
2	7:12:1	7	89,4	0,187	0,28	0,42	80	80	80
3	6:11:1	6	87,8	0,214	0,328	0,364	100	80	90
4	5:10:1	5	84,1	0,31	0,32	0,46	100	65	82,5
5	4:9:1	4	78,1	0,32	0,431	0,48	100	70	85
6	3:[3(7)]:1	3	69,9	0,38	0,33	0,4	100	75	87,5
7	2:4:1	2	58,9	0,391	0,27	0,343	60	75	67,5
8	1:3:1	1	33,8	0,392	0,491	0,424	60	70	65

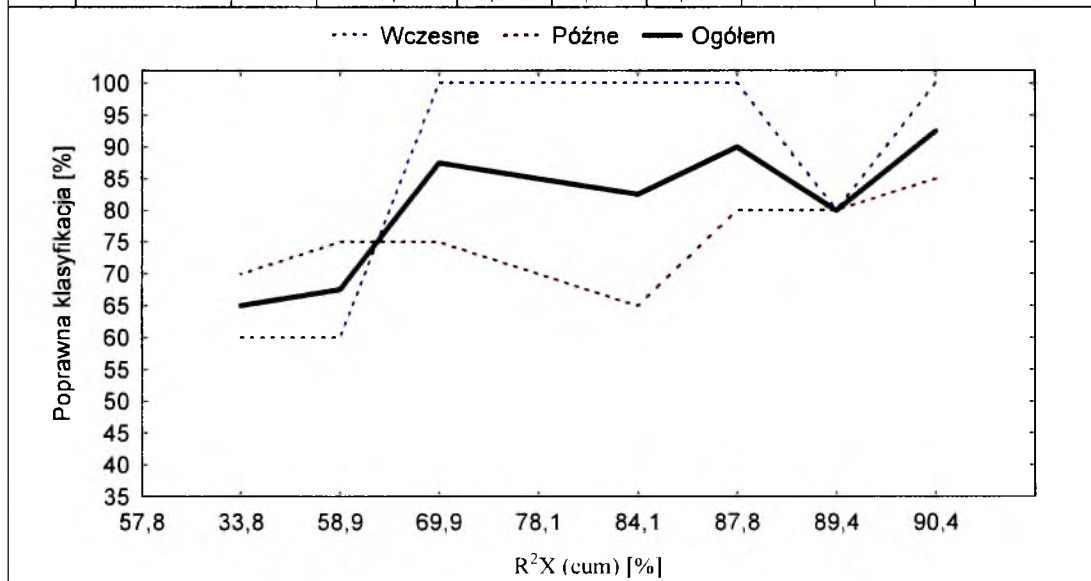


Tabela 7.52. Charakterystyka sieci oraz wynik klasyfikacji odpowiedzi tkanki mózdzku na przeprowadzoną resekcję guza.

Nr.	Topologia	Ilość PC	R ² X (cum) [%]	Błąd			Poprawna klasyfikacja [%]		
				U	W	T	Resekcja	Brak	Ogółem
1	9:[3(17)]:1	9	93,6	0,29	0,345	0,431	100	83,3	91,7
2	8:[3(16)]:1	8	92,7	0,32	0,45	0,46	100	83,3	91,7
3	7:14:1	7	90,9	0,363	0,37	0,375	100	83,3	91,7
4	6:13:1	6	88,4	0,136	0,345	0,636	80	83,3	81,7
5	5:11:1	5	84,2	0,437	0,446	0,45	85	100	92,5
6	4:[3(8)]:1	4	78,3	0,3	0,446	0,484	85	100	92,5
7	3:6:1	3	69,7	0,45	0,342	0,48	100	83,3	91,7
8	2:5:1	2	58,3	0,458	0,382	0,455	70	83,3	76,7
9	1:3:1	1	37,1	0,443	0,324	0,51	70	83,3	76,7

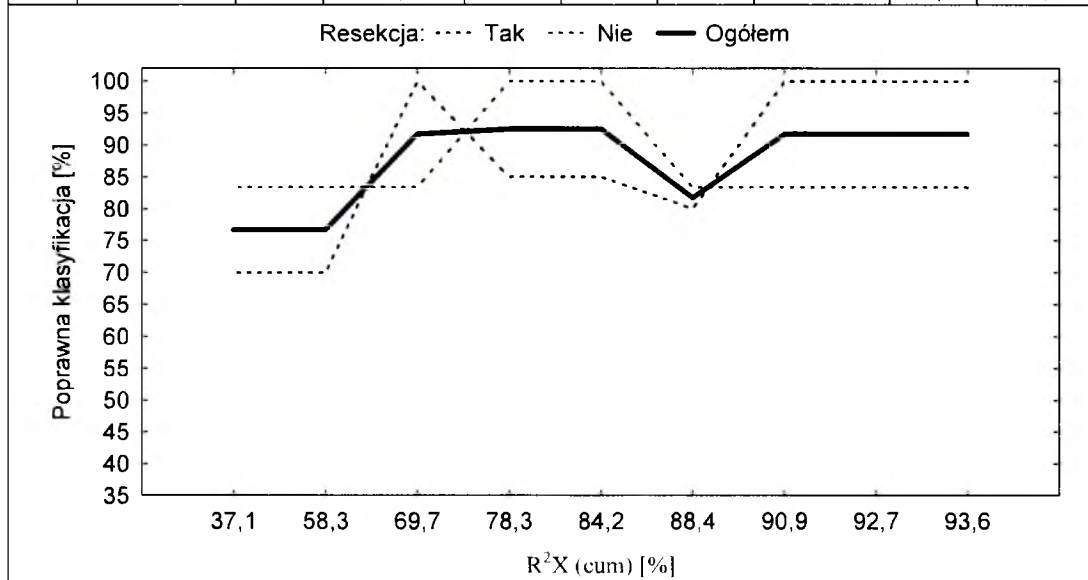


Tabela 7.53. Charakterystyka sieci oraz wynik klasyfikacji odpowiedzi tkanki mózdzku na zastosowanie chemioterapii.

Nr.	Topologia	Ilość PC	R^2X (cum) [%]	Błąd			Poprawna klasyfikacja [%]		
				U	W	T	Chemioterapia	Brak	Ogółem
1	10:18:1	10	94,7	0,146	0,241	0,385	72,7	75	73,9
2	9:[3(17)]:1	9	93,8	0,257	0,438	0,523	100	75	87,5
3	8:16:1	8	92,8	0,441	0,553	0,464	81,8	83,3	82,6
4	7:13:1	7	91	0,473	0,58	0,5	81,8	83,3	82,6
5	6:12:1	6	88,4	0,334	0,426	0,433	81,8	75	78,4
6	5:[3(11)]:1	5	84,1	0,392	0,51	0,682	100	91,7	95,9
7	4:[3(9)]:1	4	78,6	0,61	0,413	0,54	81,8	83,3	82,6
8	3:7:2	3	70,4	0,518	0,47	0,456	72,7	91,7	82,2
9	2:[5(6)]:1	2	59,1	0,417	0,462	0,446	81,8	83,3	82,6
10	1:4:2	1	37,7	0,433	0,468	0,512	72,7	75	73,9

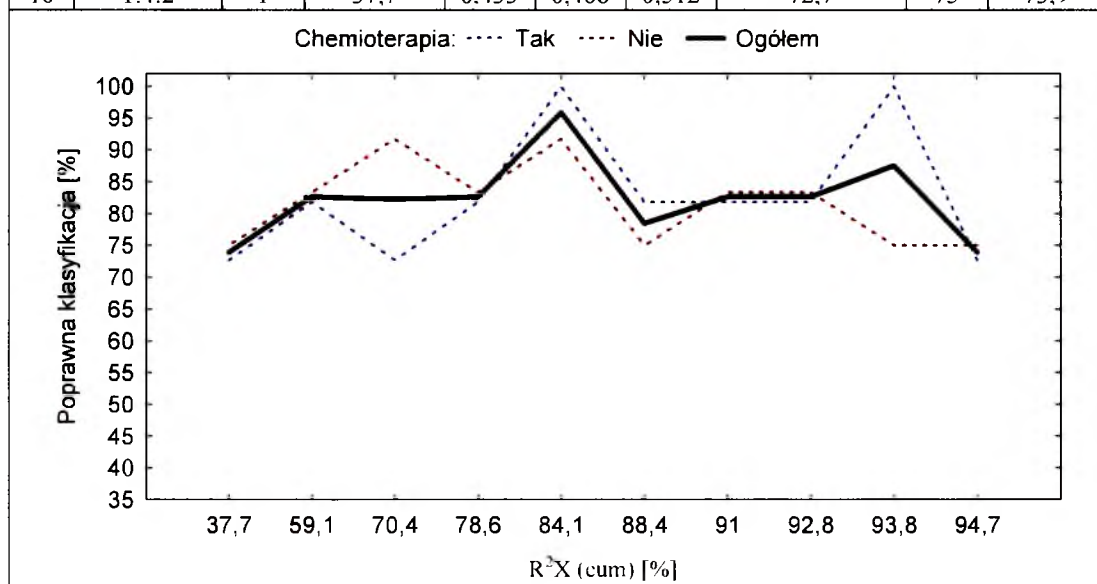


Tabela 7.54. Charakterystyka sieci oraz wynik klasyfikacji stopnia złośliwości nowotworu.

Nr.	Topologia	Ilość PC	R ² X (cum) [%]	Błąd			Poprawna klasyfikacja [%]		
				U	W	T	G: I-II	G-IV	Ogółem
1	8:3:1	8	94	0,488	0,493	0,494	77,8	83,3	80,6
2	7:3:1	7	92,3	0,487	0,512	0,495	88,9	75	82
3	6:3:1	6	89,5	0,463	0,439	0,51	88,9	75	82
4	5:7:1	5	85,2	0,531	0,49	0,498	88,9	75	82
5	4:4:1	4	78,7	0,461	0,472	0,478	77,8	75	76,4
6	3:3:1	3	71	0,442	0,486	0,6	77,8	91,7	84,8
7	2:2:1	2	58,6	0,488	0,484	0,49	88,9	83,3	86,1
8	1:2:1	1	33,5	0,485	0,49	0,525	77,8	83,3	80,6

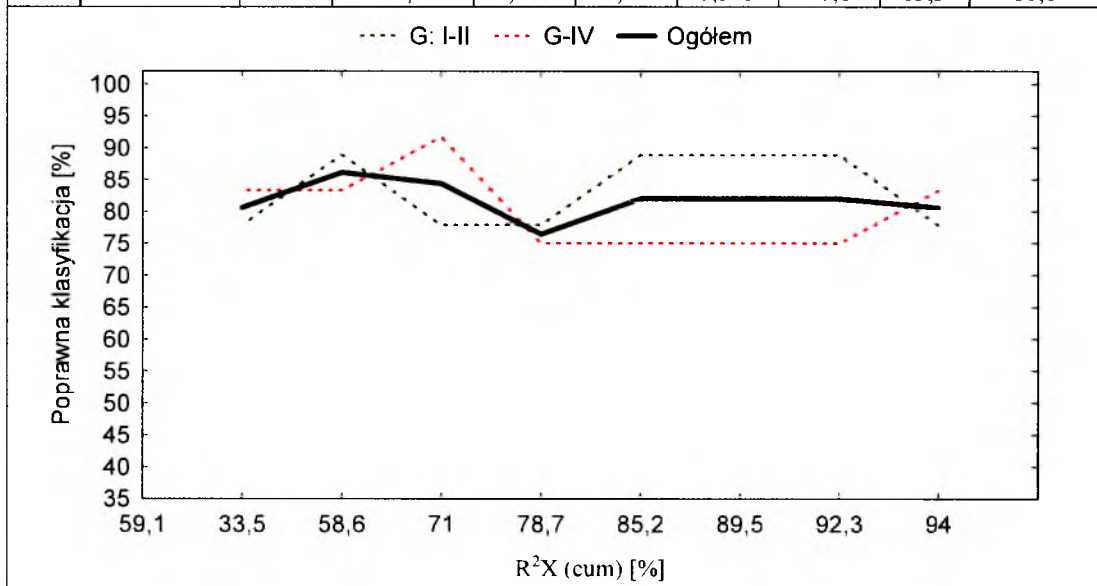
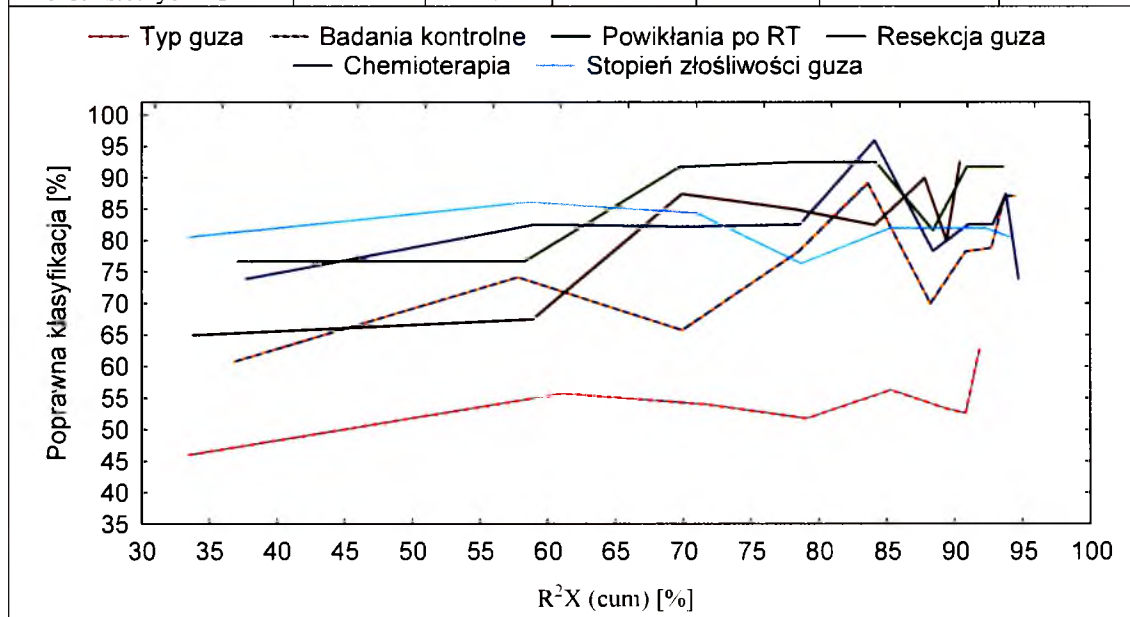


Tabela 7.55. Porównanie poprawnych klasyfikacji dla poszczególnych sieci.

	Typ guza	Badania kontrolne	Powikłania po RT	Resekcja guza	Chemioterapia	Stopień złośliwości guza
Maksimum poprawnej klasyfikacji [%]	62,7	89,2	92,5	92,5	95,9	86,1
R^2X (cum) [%] w maksimum klasyfikacji	91,8	83,6	90,4	78,3	84,1	58,6
Liczba PC w maksimum klasyfikacji	8	5	8	4	5	2
Liczba istotnych PC	8	10	8	9	10	8



Wszystkie sieci realizujące zadanie klasyfikacji dla dwóch klas przypadków (z wyłączeniem stopnia złośliwości nowotworu) uzyskały ponad 90% poprawnych klasyfikacji. Również sieć klasyfikująca grupy wyznaczone na podstawie badań kontrolnych (3 klasy) uzyskała bardzo dobrą jakość klasyfikacji zbliżoną do 90% (89,2%). Wyraźne pogorszenie jakości sieci jest widoczne dla sieci klasyfikującej grupy histopatologiczne. W tym przypadku otrzymano jedynie 62,7% poprawnych klasyfikacji. Aby uzyskać wysoką zdolność klasyfikacyjną dla powyższych danych wejściowych, konieczne było zachowanie minimum 71% oryginalnej wariancji, wyrażonej poprzez odpowiednią liczbę składowych głównych. Przy czym dla czterech z sześciu problemów klasyfikacyjnych nie było potrzeby wykorzystywania wszystkich istotnych składowych głównych jako zmiennych wejściowych do uczenia sieci.

7.2.6.2 Klasyfikacja po redukcji wymiarów zmiennych wejściowych algorytmem

BFS

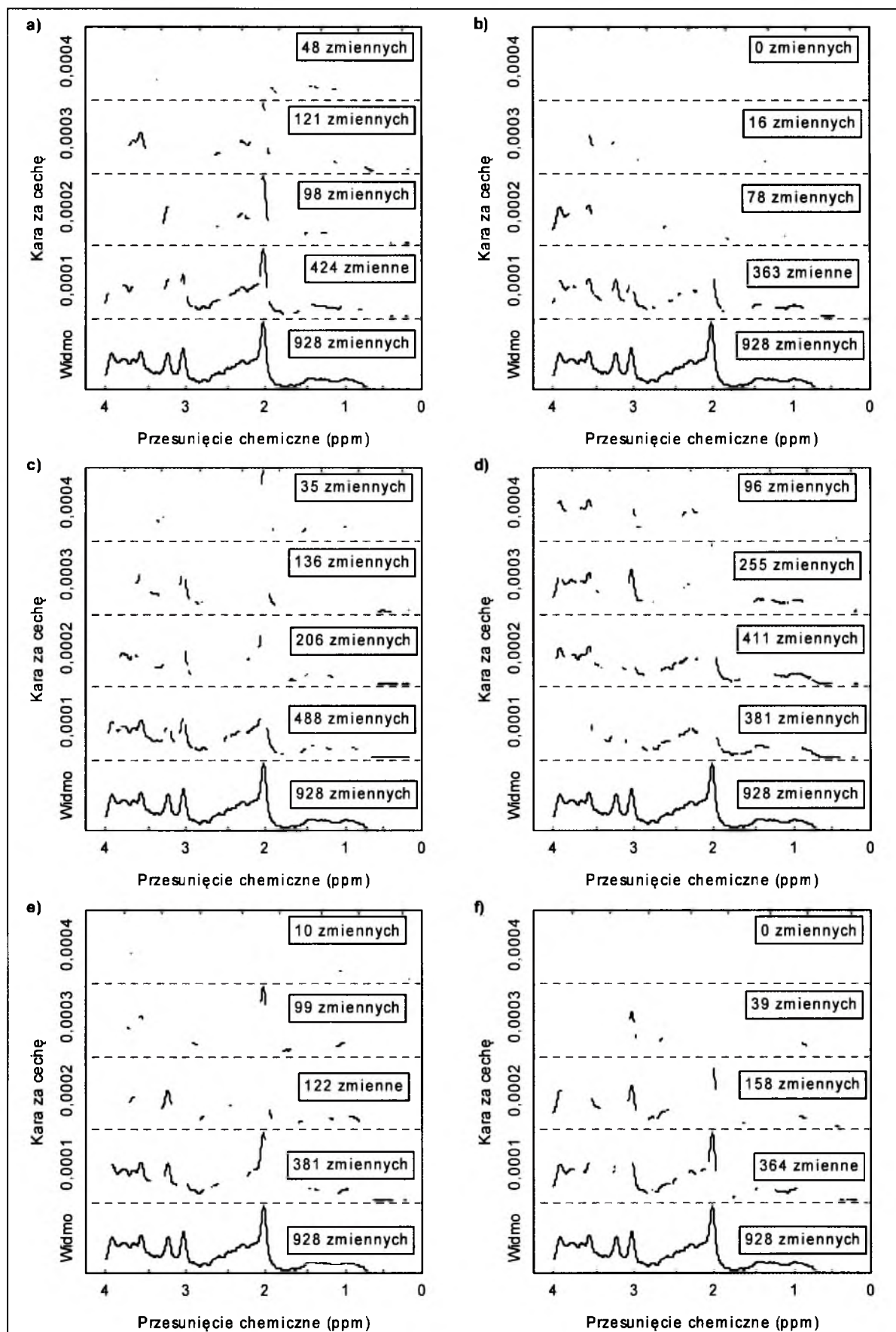
Redukcja liczby zmiennych wejściowych została przeprowadzona dla każdego ze zbiorów uczących, za każdym razem dla 4 różnych wartości parametru *kara za cechę*: 0,001, 0,002, 0,003, 0,004. Wyniki działania algorytmu BFS są zamieszczone na rysunku 7.23, gdzie zmienne wejściowe uznane za istotne dla danego zadania klasyfikacyjnego są zestawione z kompletnym widmem ^1H MRS „zdrowego” mózgu. Wykorzystanie widma pochodzącego od zdrowego ochotnika zamiast jednego z widm podlegających analizie jest umotywowane tym, że w widmach patologicznych niektóre sygnały mogą ulegać istotnemu osłabieniu, natomiast w prawidłowym widmie łatwo jest dokonać szybkiej, wzrokowej identyfikacji sygnałów na skali ppm.

Podobnie jak w przypadku redukcji liczby zmiennych metodą PCA uczenie sieci dla każdego z problemów klasyfikacyjnych przebiegało od największej do najmniejszej liczby istotnych, względem algorytmu BFS, zmiennych wejściowych. Tabele 7.56 – 7.61 prezentują charakterystyki najlepiej nauczonych sieci MLP wraz z wynikami klasyfikacji przypadków testowych (T_{zew}) dla:

- grup histopatologicznych – tabela 7.56,
- grup wyznaczonych na podstawie badań kontrolnych – tabela 7.57,
- wczesnych i późnych powikłań po radioterapii (jako granicę pomiędzy obiema grupami przyjęto okres 90 dni) – tabela 7.58,
- odpowiedzi tkanki mózdzku na przeprowadzoną resekcję guza – tabela 7.59,
- odpowiedzi tkanki mózdzku na zastosowanie chemioterapii – tabela 7.60,
- stopnia złośliwości nowotworu – tabela 7.61.

Tabele zostały dodatkowo uzupełnione wykresami trendu zmian poprawnych klasyfikacji w funkcji liczby zmiennych wejściowych podanych na wejścia sieci.

W tabeli 7.62 porównano parametry poprawnych klasyfikacji dla każdego z problemów klasyfikacyjnych.



Rysunek 7.25. Wyniki działania algorytmu BFS dla czterech wartości parametru „kara za cechę”.
**Rozróżnienie grup histopatologicznych (a), stan guza (b), wczesne / późne zmiany popromienne (c),
operacja / brak operacji (d), chemioterapia / brak chemioterapii (e), stopień złośliwości guza (f).**

Tabela 7.56. Charakterystyka sieci oraz wynik klasyfikacji grup histopatologicznych.

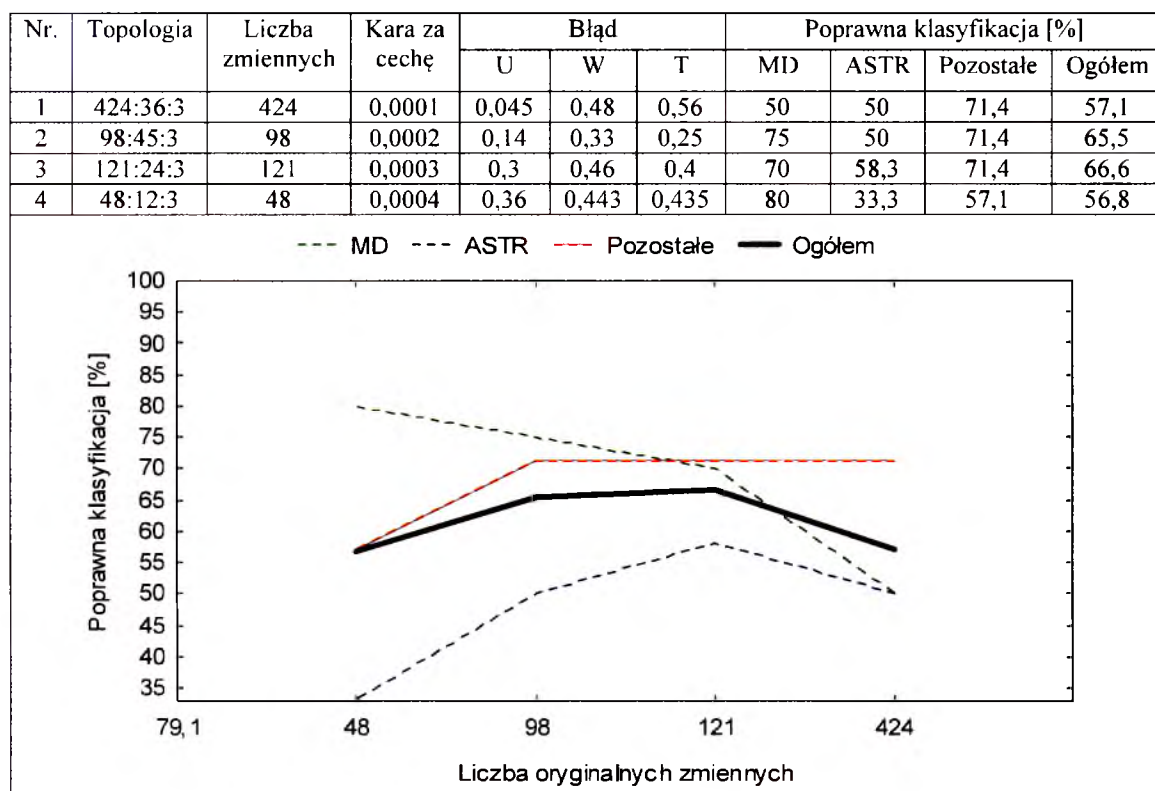


Tabela 7.57. Charakterystyka sieci oraz wynik klasyfikacji grup wyznaczonych na podstawie badań kontrolnych.

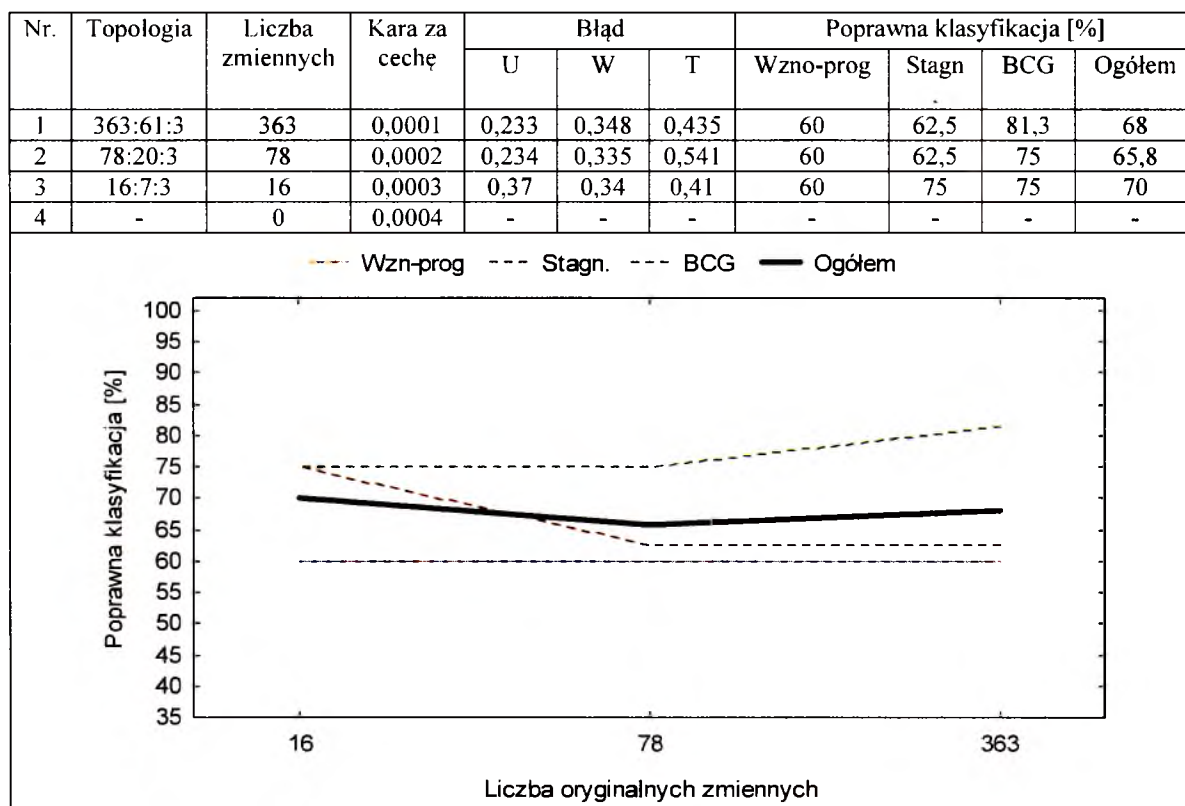


Tabela 7.58. Charakterystyka sieci oraz wynik klasyfikacji wczesnych i późnych powikłań po radioterapii.

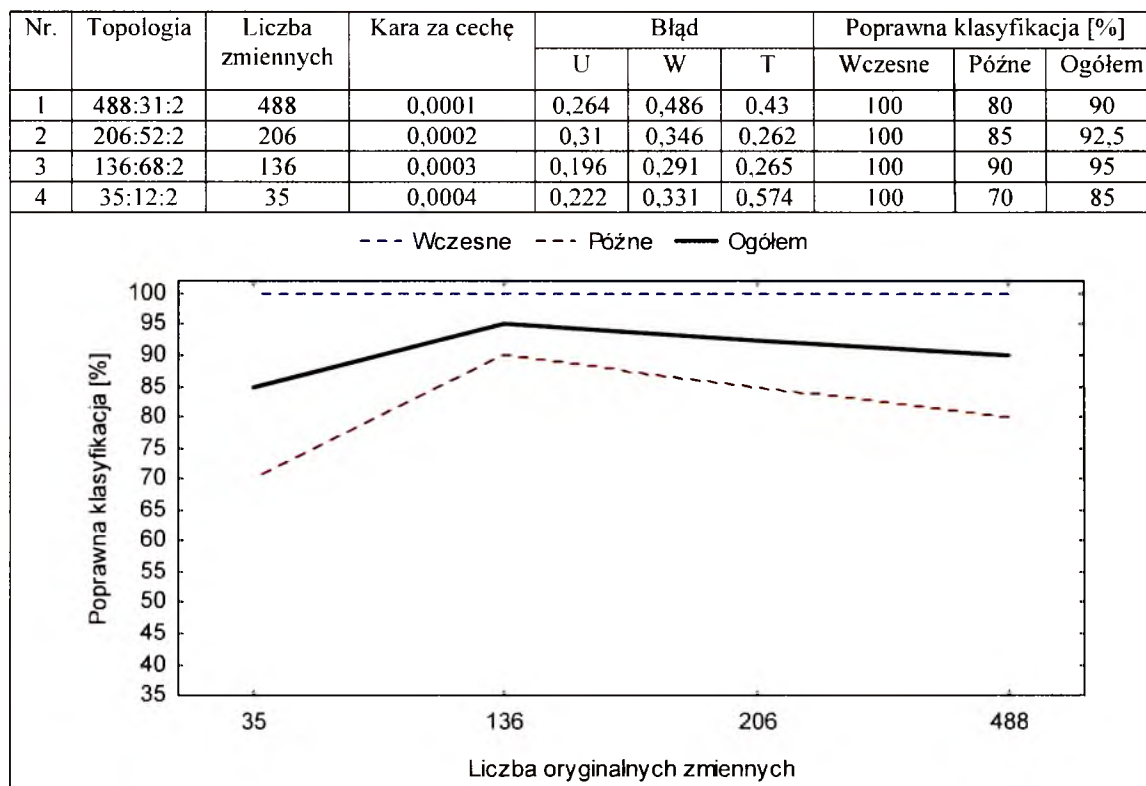


Tabela 7.59. Charakterystyka sieci oraz wynik klasyfikacji odpowiedzi tkanki mózdzku na przeprowadzoną resekcję guza.

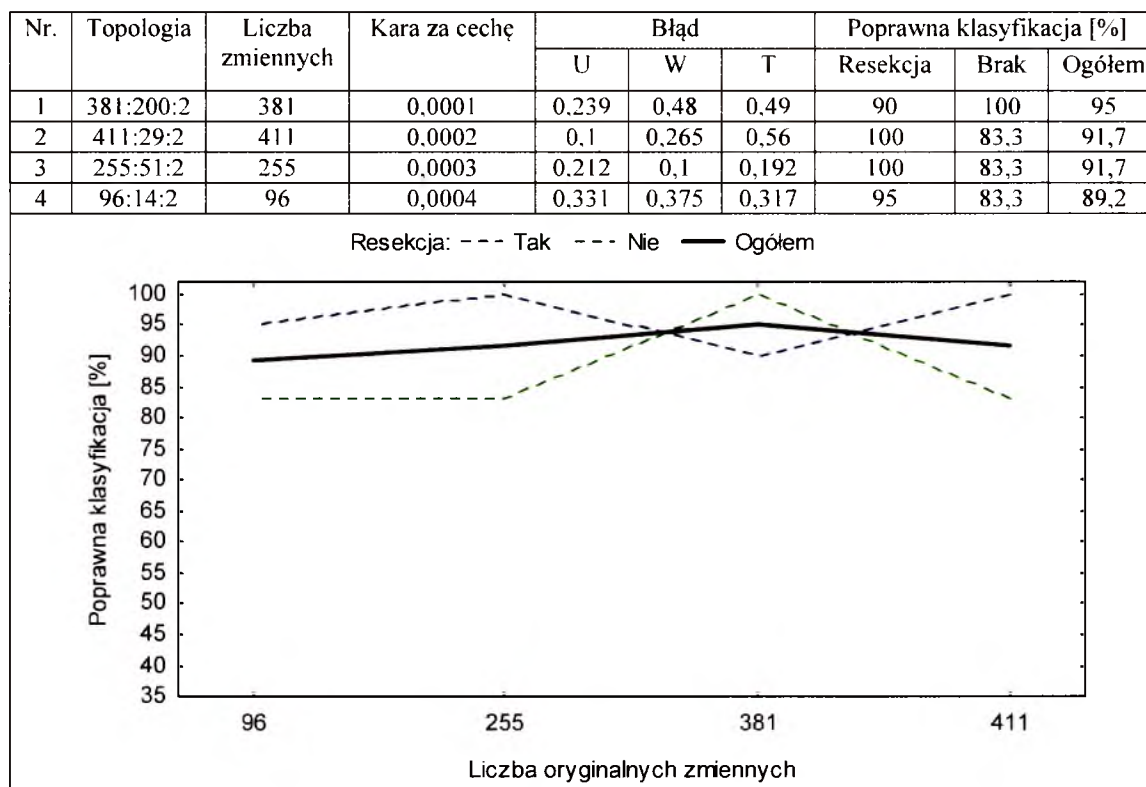


Tabela 7.60. Charakterystyka sieci oraz wynik klasyfikacji odpowiedzi tkanki mózdzku na zastosowanie chemioterapii.

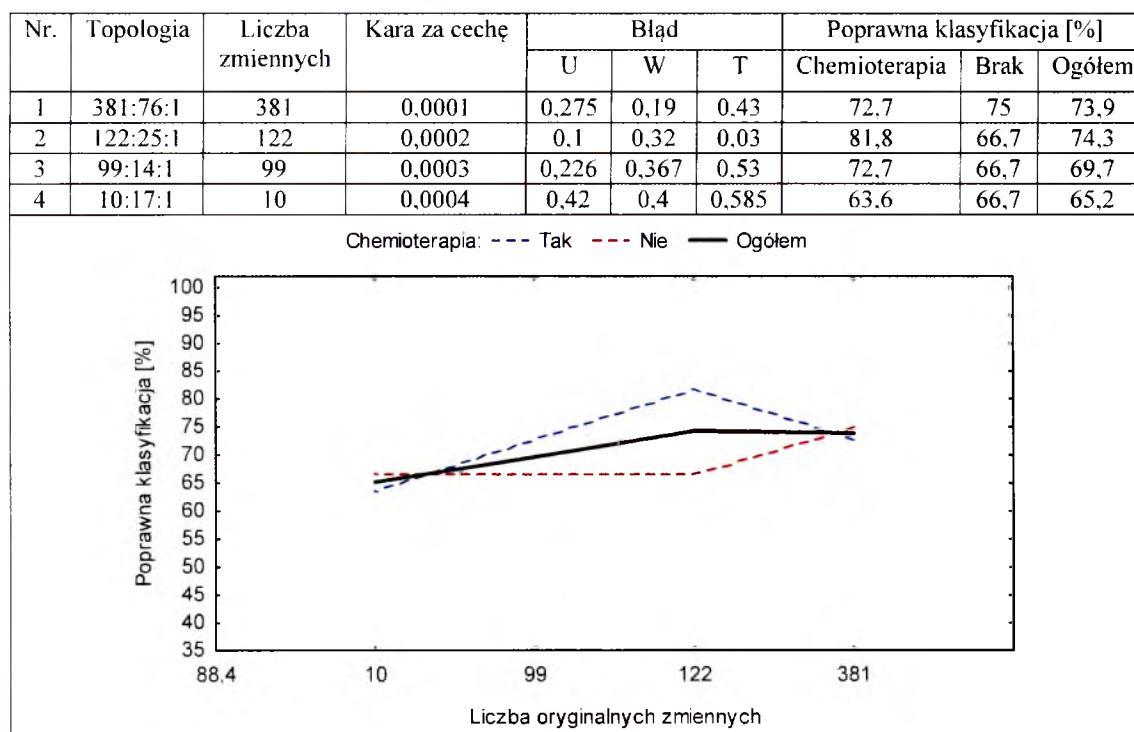


Tabela 7.61. Charakterystyka sieci oraz wynik klasyfikacji stopnia złośliwości nowotworu.

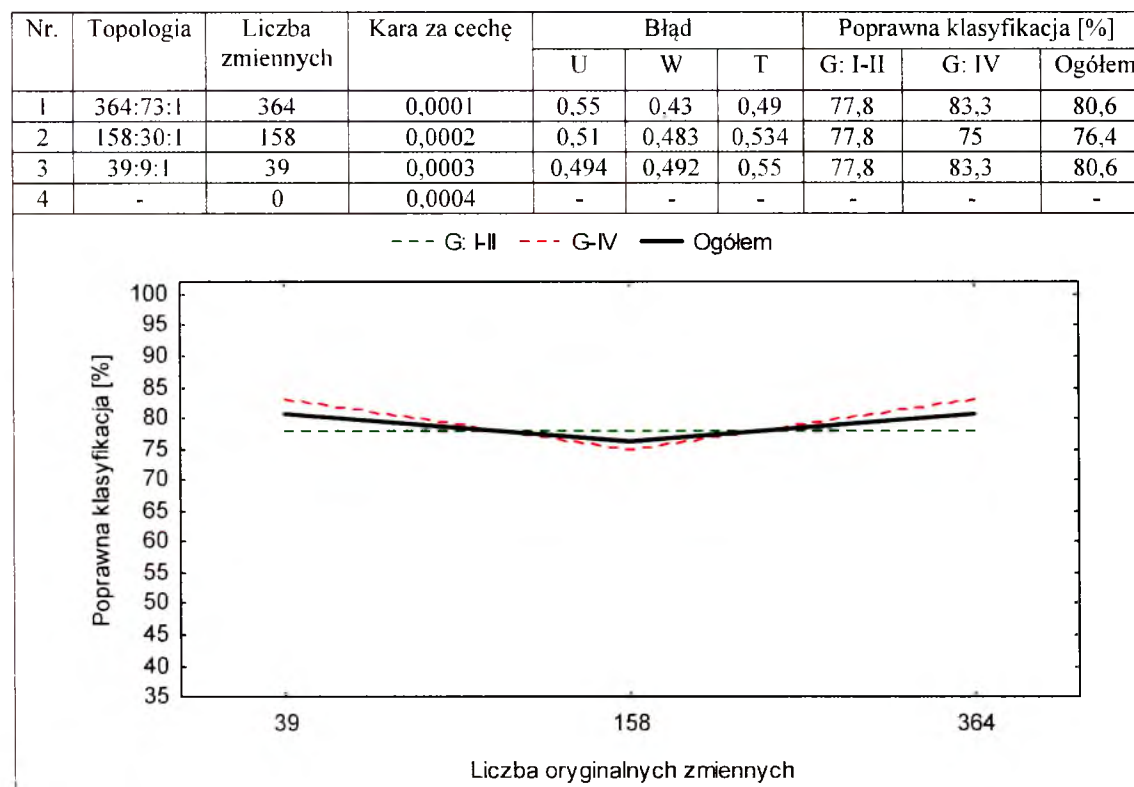
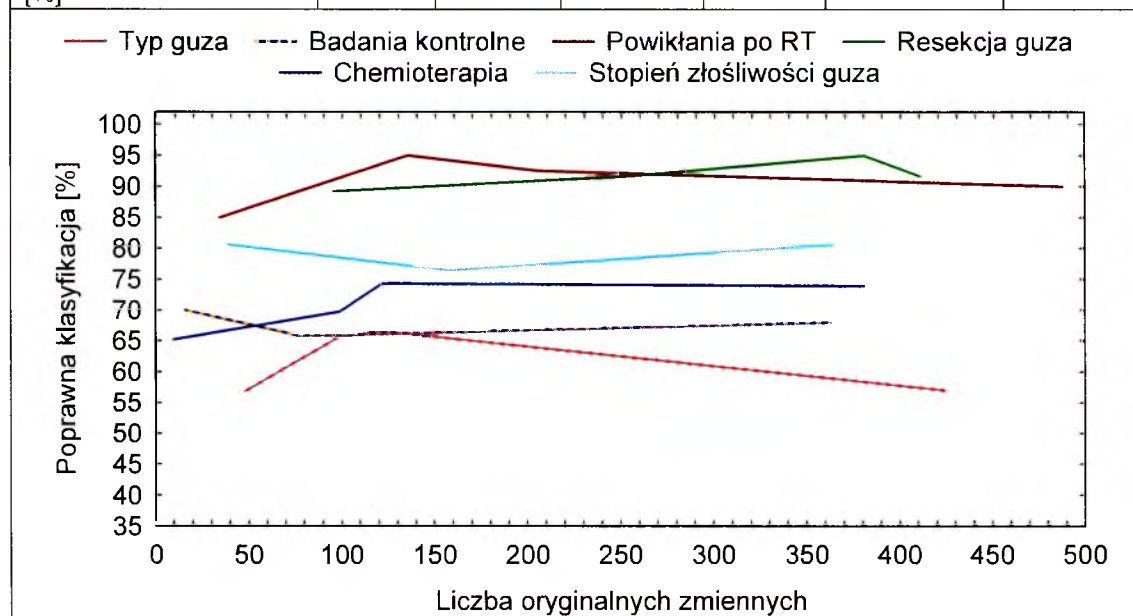


Tabela 7.62. Zestawienie poprawnych klasyfikacji dla poszczególnych sieci.

	Typ guza	Badania kontrolne	Powikłania po RT	Resekcja guza	Chemioterapia	Stopień złośliwości guza
Maksimum poprawnej klasyfikacji [%]	66,6	70	95	95	73,9	80,6
Kara za cechę	0,0003	0,0003	0,0003	0,0001	0,0001	0,0003
Liczba istotnych oryginalnych zmiennych	121	16	136	381	381	39
Procentowa wartość całkowitej liczby oryginalnych zmiennych [%]	13	1,7	14,7	41,1	41,1	4,2



Wysoką zdolność klasyfikacyjną (poziom poprawnych klasyfikacji równy 95%) na zbiorze testowym uzyskały jedynie sieci rozróżniające pacjentów pod kątem przebytej lub nie resekcji oraz ze względu na wczesny i późny odczyn popromienny. Dla powyższych sieci maksymalną zdolność klasyfikacyjną osiągnięto podając na wejścia odpowiednio 41,1 i 14,7% liczby oryginalnych zmiennych. Zdecydowane gorsze zdolności klasyfikacyjne wykazuje sieć rozróżniająca pacjentów pod kątem zastosowanej lub nie chemioterapii oraz obie sieci, których zadaniem było klasyfikowanie 3 klas przypadków (typ guza oraz badania kontrolne).

7.2.6.3 Porównanie zdolności klasyfikacyjnych sieci MLP w zależności od wybranej metody redukcji wymiaru zmiennych wejściowych

Zestawienie najlepszych wyników uzyskanych dla obu metod redukcji wymiaru zmiennych zostało przedstawione w tabeli 7.63. Maksymalne wartości procentowe poprawnych klasyfikacji są rozłożone po równo pomiędzy PCA i BFS, jednakże w metodzie PCA aż pięć z sześciu sieci uzyskało bardzo dobre wyniki, podczas gdy zastosowanie algorytmu BFS daje w efekcie tylko trzy dobre jakościowo sieci (o liczbie poprawnych klasyfikacji powyżej 80%).

Tabela 7.63. Porównanie zdolności klasyfikacyjnych najlepszych sieci MLP dla dwóch metod redukcji wymiaru zmiennych wejściowych: PCA i BFS.

Typ guza							
Poprawna klasyfikacja [%]							
PCA				BFS			
MD	ASTR	Pozostałe	Ogółem	MD	ASTR	Pozostałe	Ogółem
50	66.7	71.4	62,7	70	58.3	71.4	66,6
Badania kontrolne							
Poprawna klasyfikacja [%]							
PCA				BFS			
Wzn-prog.	Stagn.	BCG	Ogółem	Wzn-prog.	Stagn.	BCG	Ogółem
80	100	87,5	89,2	60	75	75	70
Powikłania po RT							
Poprawna klasyfikacja [%]							
PCA				BFS			
Wczesne	Późne	Ogółem		Wczesne	Późne	Ogółem	
100	85	92,5		100	90	95	
Resekcja guza							
Poprawna klasyfikacja [%]							
PCA				BFS			
Resekcja	Brak	Ogółem		Resekcja	Brak	Ogółem	
85	100	92,5		90	100	95	
Chemioterapia							
Poprawna klasyfikacja [%]							
PCA				BFS			
Chemioterapia	Brak	Ogółem		Chemioterapia	Brak	Ogółem	
100	91.7	95,9		72,7	75	73,9	
Stopień złośliwości guza							
Poprawna klasyfikacja [%]							
PCA				BFS			
G: I-II	G-IV	Ogółem		G: I-II	G-IV	Ogółem	
88,9	83.3	86,1		77,8	83,3	80,6	

7.2.6.4 Dyskusja

Sztuczne sieci neuronowe okazały się skutecznym narzędziem do klasyfikacji widm ^1H MRS, dla których liczba zmiennych została uprzednio zredukowana za pomocą metody PCA lub algorytmu BFS. Porównanie najlepszych wyników uzyskanych dla obu metod redukcji nie wykazuje radykalnych różnic między nimi, jednakże to sieci uczone oryginalnymi zmiennymi zredukowanymi algorytmem BFS częściej zawodzą. Chociaż dwie z nich osiągnęły aż 95% poprawnych klasyfikacji, to klasyfikacja przypadków na podstawie wyników badań kontrolnych oraz przebytej lub nie chemioterapii wypadła zdecydowanie gorzej niż dla zmiennych zredukowanych metodą PCA. Kolejną zaletą metody PCA jest szybkość jej działania. Podczas gdy algorytm BFS wymaga od kilku do kilkudziesięciu godzin pracy (w zależności od liczby zmiennych i zdolności obliczeniowej komputera), to redukcja wymiarów metodą PCA może zostać zrealizowana w ciągu kilku minut. Podstawową wadą metody PCA jest konieczność tworzenia nowego modelu PCA i ponownego uczenia sieci, kiedy chcemy dodać do sieci nowe przypadki uczące – wynika to z właściwości metody PCA (w skrajnych przypadkach dodanie nawet jednego przypadku może zmienić kierunek największej wariancji w całym zbiorze danych). Z tego samego powodu należy każdorazowo (po stworzeniu nowego modelu PCA lub po dodaniu nowych przypadków testowych) wykonać projekcję przypadków z zewnętrznego zbioru testowego na hiperpłaszczyznę rozciągniętą na składowych głównych. W przypadku algorytmu BFS (jeżeli tylko pewne jest, że wybrał on odpowiednie zmienne) nie ma potrzeby powtarzania procesu doboru zmiennych. Wystarczy ponownie przeprowadzić proces uczenia istniejącej, nauczonej uprzednio sieci wykorzystując stare i nowe przypadki uczące opisane poprzez zmienne wskazane przez algorytm BFS. Jest to możliwe dlatego, że w wyniku działania algorytmu BFS otrzymujemy po prostu zredukowaną liczbę oryginalnych zmiennych, a nie jak w PCA zupełnie nowe zmienne będące liniową transformacją oryginalnych zmiennych.

Wśród dostępnego piśmiennictwa trudno jest znaleźć prace porównujące te dwie metody redukcji zmiennych w sposób bezpośredni, niewiele jest również publikacji poświęconych klasyfikacji widm ^1H MRS metodą ANN. Warto wyróżnić dwie publikacje poświęcone klasyfikacji danych udostępnionych przez projekt INTERPRET [García-Gómez 2009, Lisboa 2008]. W pierwszej z tych prac [García-Gómez 2009] porównano szereg klasyfikatorów (w tym MLP) oraz kilka metod redukcji wymiarów zmiennych (również PCA). Autorzy porównywali parami dane pochodzące od czterech typów nowotworów (glioblastoma, łagodne oponiaki, łagodne glejaki i guzy przerzutowe,

łącznie 211 widm) uzyskując poprawną klasyfikację rzędu 90% dla pięciu z sześciu par i 78% dla ostatniej pary (glioblastoma vs. guz przerzutowy) dla zewnętrznego zbioru testowego (97 widm). Sieci MLP uzyskały najlepszy spośród wszystkich klasyfikatorów wynik przy podaniu na wejście sieci całego widma (190 punktów spektralnych) oraz składowych głównych PCA, przy czym autorzy nie podają liczby użytych składowych głównych. Tą dużo lepszą jakość sieci rozróżniających typy nowotworów w porównaniu do sieci przedstawionej w tej pracy należy tłumaczyć czterema aspektami: widma bezpośrednio z tkanki nowotworowej (w niniejszej pracy obszar rejestracji widma leżał na granicy łoża pooperacyjnej lub guza), ponad dwukrotnie więcej dostępnych przypadków uczących, zaawansowany post-processing widm ^1H MRS zgodnie z protokołem INTERPRET [Tate 2006], skrótowo opisanym w rozdziale 3.2 oraz porównywanie parami grup nowotworów. Przy czym szczególne znaczenie ma właśnie liczba neuronów wyjściowych w sztucznej sieci neuronowej. W przypadku dwóch klas mamy do czynienia z problemem binarnym, którego rozwiązanie może być przedstawione za pomocą jednego neuronu wyjściowego, natomiast kiedy problem klasyfikacyjny dotyczy trzech lub więcej klas, potrzeba odpowiednio dwóch lub więcej neuronów wyjściowych – a wraz ze wzrostem ich liczby spada zdolność predykcyjna sieci [Masters 1993]. Z drugiej strony zastosowanie kilku sieci realizujących zagadnienia binarne często wymaga zastosowania dodatkowego klasyfikatora porównującego wyniki z poszczególnych sieci, natomiast sieć prawidłowo realizująca zagadnienia wieloklasowe daje na swoim wyjściu gotowe rozwiązanie problemu. W drugiej pracy [Lisboa 2008] autorzy wykorzystali algorytm redukcji wymiaru zmiennych podobny do opisanego w rozdziale 5.3.6 oraz perceptron jednowarstwowy (bez warstwy ukrytej) do klasyfikacji 195 widm zarejestrowanych dla długiego i krótkiego czasu echa, TE, dla trzech grup nowotworów (łagodne glejaki, nowotwory złośliwe i oponiaki). W wyniku otrzymano 98.46% i 91.08% poprawnych klasyfikacji odpowiednio dla 18 i 9 zmiennych wytypowanych przez algorytm redukcji zmiennych z 390 punktów spektralnych (po 195 dla krótkiego i długiego czasu TE). Niestety autorzy w sposób nie do końca jasny opisują proces testowania sieci, podkreślając równocześnie, że sieci były uczone całym dostępnym zestawem danych – najprawdopodobniej zamiast zewnętrznego zbioru testowego proces walidacji i testowania oparty został jedynie na 5-cio krotnej walidacji krzyżowej, a przedstawione wyniki dotyczą klasyfikacji wszystkich przypadków, łącznie z wykorzystanymi podczas uczenia sieci.

Wśród starszych publikacji na szczególną uwagę zasługuje praca Poptani [Poptani 1999] prezentująca wyniki klasyfikacji metodą sieci neuronowych całych widm ^1H MRS, ale o niskiej rozdzielczości (75 punktów spektralnych dla zakresu od 0.6 do 3,4 ppm). Dla dwóch sieci o odpowiednio czterech (zdrowy mózg, guz, gruźliczak, ropień) i pięciu (zdrowy mózg, glejak łagodny, glejak złośliwy, gruźliczak, ropień) neuronach wyjściowych autorzy otrzymali dobre zdolności klasyfikacyjne (73 – 100%) dla zewnętrznego zbioru testowego.

Niezależnie od cytowanych powyżej publikacji wynik klasyfikacji grup histopatologicznych na poziomie 60% (tabela 7.63) jest niezadowalający. Porównując wyniki umieszczone w tabelach 7.49 i 7.56 można zauważyć, że sieci MLP nie osiągają wysokiej wartości poprawnych klasyfikacji dla żadnej z grup histopatologicznych. Przyczyn tej sytuacji należy upatrywać w stosunkowo małej liczbie przypadków uczących oraz przede wszystkim w lokalizacji obszarów pomiarowych, które nie znajdowały się bezpośrednio w tkance guza, lecz na granicy guza lub łożu pooperacyjnej i tkanki zdrowej oraz w tkance zdrowej. Dodając do tego wiele nakładających się efektów związanych z procesem leczenia otrzymujemy niezwykle skomplikowany zestaw danych. Niemniej jednak problem nieinwazyjnej klasyfikacji nowotworów jest obecnie jednym z najsilniej badanych zagadnień w wielowymiarowej analizie widm spektroskopii protonowej, dlatego też konieczne jest przeprowadzenie analogicznych analiz i prób klasyfikacyjnych na nowym zestawie danych.

Zdecydowanie lepszą zdolność klasyfikacyjną prezentują sieci rozróżniające stopień złośliwości nowotworu (tabela 7.63). Poprawę uzyskano między innymi dzięki scaleniu trzech stopni złośliwości guza (G: I, II, IV) w dwie grupy odpowiadające nowotworom łagodnym i złośliwym (G: I-II, G-IV). Dzięki temu zabiegowi nie tylko zwiększyła się liczebność przypadków uczących dla każdej z klas, ale również uniknięto zmuszania sieci do wyszukiwania dużo subtelniejszych różnic pomiędzy konkretnymi typami nowotworów. Jednocześnie uzyskane wyniki wskazują na to, że ślad metaboliczny po przebyciu nowotworów złośliwych i łagodnych wyraźnie różni się od siebie, nawet po upływie dłuższego czasu. Poprawne klasyfikacje rzędu 80% są jednak niższe, niż wyniki prezentowane w cytowanych wyżej pracach [García-Gómez 2009, Lisboa 2008, Poptani 1999].

Według wiedzy autora, obecnie nie istnieją publikacje poświęcone zastosowaniu ANN i ^1H MRS w monitorowaniu efektów leczenia oraz detekcji wznowy lub progresji

guza, przy czym wartości poprawnych klasyfikacji: od 89,2 do 95,9%, wskazują na potencjalnie duże możliwości zastosowania kombinacji ANN i ^1H MRS w tej materii.

Na osobny komentarz zasługują wyniki algorytmu BFS. Ponieważ algorytm ten jest również realizowany przez sieć neuronową, wynik jego pracy nie zawsze może być intuicyjnie przewidziany, np. narzucenie minimalnie większej wartości parametru *kara za cechę* niekoniecznie pokutuje usunięciem większej liczby zmiennych niż dla mniejszej wartości. Ponadto w skomplikowanych zestawach danych opisanych przez dużą liczbę zmiennych kilkukrotne uruchomienie algorytmu, nawet dla identycznej wartości parametru *kara za cechę*, rzadko da w wyniku identyczne zestawy istotnych.

Co ciekawe, algorytm BFS nie zawsze wybiera punkty leżące na wierzchołkach sygnałów poszczególnych metabolitów, ale często za istotne przyjmuje punkty leżące na zboczach tych sygnałów, co może wskazywać na istotne zmiany w szerokościach połówkowych sygnałów w widmie (zjawisko to ma swoje źródło w zmianach czasów relaksacji spin-spin (T_2) dla poszczególnych metabolitów obserwowanych w stanach patologicznych [Kamada 1994, Isobe 2002]). To spostrzeżenie powinno być brane pod uwagę podczas ręcznego wybierania zakresów spektralnych, które zostaną podane na wejście sieci; znaczne ograniczenie liczby zmiennych – poprzez wybranie jedynie wąskich zakresów spektralnych pokrywających wierzchołki sygnałów – może utrudnić uzyskanie optymalnych wyników.

O ile wysoki procent poprawnych klasyfikacji dla kilku pierwszych składowych głównych nie jest niczym zaskakującym, zastanawia bardzo dobra jakość klasyfikacji sieci, która na wejście otrzymuje jedynie niewielką liczbę oryginalnych zmiennych (uznanych za istotne przez algorytm BFS), jak ma to miejsce w klasyfikacji grup wyznaczonych na podstawie badań kontrolnych (tabela 7.56) oraz stopnia złośliwości nowotworu (tabela 7.60). W pierwszym przypadku algorytm BFS wybrał jako istotne zakresy spektralne (rysunek 7.25 b) odpowiadające w przybliżeniu sygnałom rezonansowym Lac (1,34 – 1,35 ppm) i GABA (2,93 – 2,94 ppm) oraz dwa zakresy, w których obserwowane są sygnały pochodzące od tCho (3,24 – 3,25 ppm) i mI (3,51 – 3,54 ppm). Wskazane przez algorytm BFS zakresy (z wyłączeniem GABA) częściowo pokrywają się z zakresami spektralnymi wskazanymi przez model OSC PLS-DA-3 jako mającymi największy wkład w rozróżnienie poszczególnych grup wyznaczonych na podstawie wyników badań kontrolnych (bezpośrednie porównanie tych wyników jest możliwe do przeprowadzenia, ponieważ w modelu OSC PLS-DA-3 grupy wznowy

(Wznowa) i progresji (Progresja), które zostały połączone w jedną grupę (wzno-prog) w klasyfikacji metodą ANN, nie różniły się między sobą).

W drugim przypadku, jako istotne zostały wybrane zakresy odpowiadające sygnałom asparaginianu (2,773 – 2,805 ppm), tCho (3,175 – 3,212 ppm) i mI (3,523 – 3,527 ppm) oraz zakres (3,572 – 3,585 ppm), do którego nie można przypisać pojedynczego neurometabolitu rejestrowanego w polu 2 T (rysunek 7.25 f). Do wspomnianego zakresu mogą swój wkład dawać liczne sygnały, w tym pochodzące od glicyny, glicerolu oraz tCho i mI. Porównanie tych wyników z modelem OSC PLS-DA-7 nie jest miarodajne, ze względu na wykazane przez ten model różnice pomiędzy pierwszym G-I i drugim G-II stopniem złośliwości nowotworu, które w klasyfikacji metodą ANN zostały połączone w jedną klasę (G: I-II).

W klasyfikacji wczesnych i późnych powikłań po radioterapii algorytm BFS wyodrębnił jako istotne przedziały spektralne leżące w głównej mierze powyżej 2,7 ppm, a odpowiadające m.in. sygnałom tCr i mI oraz przypuszczalnie GABA z wyłączeniem tCho i NAA (rysunek 7.25 c). Dodatkowo jako istotny wskazany został sygnał Ace/GABA w zakresie 1,88 – 1,95 ppm oraz początkowy fragment widma pomiędzy 0,42 – 0,6 ppm. Wyniki te znajdują wyraźne odzwierciedlenie w analizie PLS-DA – model OSC PLS-DA-4 pokazuje, że obniżenie sygnałów głównych neurometabolitów (bez tCho i NAA) stanowi cechę charakterystyczną (obok wyraźnych sygnałów Lip i Lac) dla późnego odczynu popromiennego.

Algorytm BFS oraz metoda PLS-DA (model OSC PLS-DA-6) dostarczają spójnych wyników również dla klasyfikacji odpowiedzi tkanki mózdzku na zastosowanie chemioterapii. Algorytm BFS wskazał m.in. na sygnały pochodzące od Lip i Lac (0,97 – 1,1 ppm i 1,33 – 1,36 ppm), NAA i Glx (2 – 2,23 ppm), tCho (3,12 – 3,26 ppm) oraz mI i Glx (3,45 – 3,93 ppm). Zgodnie z modelem OSC PLS-DA-6 podwyższone sygnały Lip przy 0,9 ppm, NAA, tCho i Glx są charakterystyczne dla pacjentów bez chemioterapii, natomiast cechą wyróżniającą pacjentów leczonych chemioterapią są sygnały scentrowane przy 1,31 ppm (rysunek 7.14).

Odmierna sytuacja ma miejsce w przypadku klasyfikacji odpowiedzi tkanki mózdzku na przeprowadzoną resekcję guza. Zgodnie z modelem OSC PLS-DA-5 sygnały pomiędzy 0,87 – 1,5 ppm oraz tCho (3,2 ppm) i mI (3,52 ppm) to cechy różnicujące profile metaboliczne pacjentów, którzy przebyli lub nie resekcję guza. Natomiast algorytm BFS wytypował jako istotne sygnały stanowiące różnicę całego widma i sygnałów wskazanych przez model PLS-DA, z wyłączeniem Lip/Lac i Ala (1,31 – 1,48 ppm), które

zostały uznane za istotne przez obydwie metody. Wytlumaczenie tej sytuacji można znaleźć na rysunku 7.21: wzrost stężeń tCho (3.2 ppm) i mI (3,52 ppm) jest widoczny u pacjentów nie operowanych jedynie w obszarze umiejscowionym na granicy guza. Z tego powodu algorytm BFS mógł pominąć sygnały tCho i mI, ponieważ wzrost stężeń tych metabolitów jest charakterystyczny jedynie dla widm zaliczonych do grupy bez resekcji. Ze względu na redukcję liczby grup histopatologicznych przed klasyfikacją metodą sieci neuronowych porównanie działania algorytmu BFS z metodą PLS-DA jest utrudnione. W jedną grupę połączone zostały najmniej liczne grupy hemangioblastoma (HM), glioblastoma (GBM) i ependymoma (EP), a modele OCS PLS-DA-1 i OSC PLS-DA-2 ujawniły, że profile metaboliczne tych grup wykazują podwyższone (w większym (GBM) lub mniejszym (HM, EP) stopniu sygnały związków lipidowych, natomiast astrocytoma (ASTR) i medulloblastoma (MD) wykazują wyższe od pozostałych grup stężenia tCho i mI (ASTR) oraz tCho, mI, tCr i NAA (MD). Przedziały spektralne odpowiadające tym samym neurometabolitom, z wyłączeniem tCho, uznał za istotne algorytm BFS. Dodatkowo jako istotne wytypowane zostały przesunięcia chemiczne odpowiadające sygnałom pochodzącym od Glx i GABA (2,19 – 2,3 ppm) (rysunek 7.25 a).

Porównanie wyników klasyfikacji danych przy zastosowaniu tak różnych metod klasyfikacyjnych jak PLS-DA i sieci neuronowe pokazuje, że te dwie zupełnie odmienne techniki prowadzą do spójnych i uzupełniających się rezultatów.

7.3 Wnioski

W niniejszej pracy przedstawiono przykład kompletnej, metabonomicznej analizy widm ^1H MRS *in vivo*, wzbogaconej o statystykę klasyczną tam, gdzie wymagana jest subiektywna ocena „operatora” danego narzędzia metabonomicznego. Porównane zostały możliwości analizy składowych głównych (PCA), metody cząstkowych najmniejszych kwadratów – analizy dyskryminacyjnej (PLS-DA) oraz sztucznych sieci neuronowych (ANN), takich jak perceptron wielowarstwowy (MLP). Wykorzystane zostały również dodatkowe metody filtrowania danych oraz redukcji wymiaru zmiennych.

Uzyskane wyniki wskazują na istotny wpływ konkretnych czynników patologicznych (histopatologiczny typ guza, stopień złośliwości nowotworu oraz proces jego wznowy lub progresji), jak i metody leczenia (radioterapia, chemioterapia, resekcja) na metabolizm mózdzku. Istotnie różnią się również widma ^1H MRS pochodzące z różnych lokalizacji anatomicznych (granica guza/łoży pooperacyjnej, obszar referencyjny – oddalony od miejsca zmiany widocznej w badaniu obrazowym). Ponieważ profil metaboliczny zdrowego mózdzku – obszaru mózgowia cechującego się homogenicznością – jest jednorodny w całym obszarze tego narządu, implikuje to bezpośredni wniosek, że zaobserwowane różnice w profilach metabolicznych guza/łoży pooperacyjnej i obszaru referencyjnego muszą wynikać z różnic biochemicznych wygenerowanych przez działające lokalnie czynniki, takie jak proces neoplastyczny czy też czynniki indukowane samym procesem leczenia (w tym zabieg operacyjny). Zasięg wygenerowanych tak zaburzeń metabolizmu, m.in. ze względu na niewielkie rozmiary mózdzku [Solov'ev 2006], obejmuje również obszary mózdzku oddalone od miejsca bezpośredniego działania czynnika.

Metody PCA i PLS-DA oraz PLS-DA wspomagana ortogonalną korekcją sygnału (OSC) dostarczają wyników w sposób szybki i w łatwej do interpretacji formie graficznej. O ile z racji skomplikowanego charakteru danych (zróżnicowany wiek, płeć oraz nakładające się efekty poszczególnych metod leczenia) dwie pierwsze metody nie są w stanie w sposób wyraźny dokonać grupowania poszczególnych klas przypadków (dopiero klasyczna analiza statystyczna wskazuje na istotny statystycznie charakter grupowania widm na wykresach współrzędnych czynnikowych przypadków), to filtrowanie OSC znacząco poprawia jakość działania metody PLS-DA umożliwiając wgląd w subtelne różnice metaboliczne pomiędzy nierozróżnialnymi dotąd klasami przypadków.

W przypadku sieci MLP, z racji doboru parametrów uczenia metodą prób i błędów, proces analizy był znacznie dłuższy niż dla poprzednich metod, szczególnie przy zastosowaniu redukcji liczby zmiennych wejściowych metodą algorytmu wstecznego doboru cech (co realizowano również poprzez zastosowanie odpowiedniej sieci neuronowej). Jednakże po odpowiedniej redukcji zmiennych oraz nauczaniu sieci otrzymano zestaw szybko działających sieci MLP o wysokiej jakości klasyfikacyjnej (do 95,9%) sprawdzonej na zewnętrznym zbiorze testowym.

Otrzymane wyniki wypełniają założenia celu pracy oraz otwierają perspektywy przeprowadzenia nowych analiz, które nie zostały zawarte w powyższej pracy, a które pozwolą na szersze zrozumienie zaobserwowanych zaburzeń w metabolizmie mózgowia. Pozwalają też planować cel perspektywiczny – stworzenie platformy cyfrowej wspomagającej diagnostykę guzów mózgu.

Głównym elementem wymagającym uzupełnienia w przyszłościowych badaniach są dane sprzed rozpoczęcia procesu leczenia, których brak nie pozwala na bezpośrednią ocenę profili metabolicznych guzów poddanych resekcji oraz porównanie profili metabolicznych przed i po leczeniu. W niniejszej pracy dane takie nie znalazły się, ponieważ pierwsze badania diagnostyczne wykonywano w innych placówkach medycznych, a pacjenci nierzadko trafiali do Instytutu Onkologii już po wykonanym zabiegu operacyjnym; często także badanie metodą rezonansu magnetycznego zlecano po leczeniu, jako badanie kontrolne. Brak danych przedoperacyjnych zdecydowanie obniżył zdolność klasyfikacji przez sieci neuronowe grup wyznaczonych na podstawie badań histopatologicznych.

Interesujące wydaje się również porównanie pacjentów z grupą kontrolną złożoną z osób zdrowych, a w szczególności porównanie profili metabolicznych uzyskanych z obszarów referencyjnych z profilami otrzymanymi z odpowiednich obszarów dla grupy kontrolnej. Pozwoli to na bezpośrednią ocenę wpływu procesu nowotworowego na odległe od łoża pooperacyjnej obszary mózgowia.

8 Podsumowanie

W niniejszej pracy do analizy widm ^1H MRS *in vivo* zastosowano metody metabonomiczne pozwalające na automatyzację oceny i klasyfikacji zaburzeń metabolicznych mózgdzku, będących następstwem procesu nowotworowego oraz przeprowadzonego leczenia. W interpretacji rezultatów wsparto się klasyczną analizą statystyczną.

Analizom wielowymiarowym poddano 176 widm ^1H MRS *in vivo* uzyskanych od 31 pacjentów monitorowanych po leczeniu nowotworów tylnego dołu czaszki. Widma rejestrowano z obszarów umiejscowionych na granicy guza lub łoży pooperacyjnej i tkanki zdrowej oraz w oddalonym od zmiany nowotworowej obszarze referencyjnym.

Zauważono, że ze względu na skomplikowany charakter danych oraz mnogość nakładających się procesów metabolicznych skuteczność metod PCA oraz PLS-DA istotnie rośnie po zastosowaniu filtrowania OSC, a rolą metody PCA jest przede wszystkim detekcja widm odstających oraz wstępna redukcja wymiaru zmiennych.

Poddanie danych filtrowaniu OSC wyraźnie polepsza jakość modeli PLS-DA, co w rezultacie prowadzi do ujawnienia profili metabolicznych charakterystycznych dla:

- danych zgrupowanych ze względu na rozpoznanie histopatologiczne,
- grup wyznaczonych na podstawie wyników badań kontrolnych,
- wczesnych i późnych powikłań po radioterapii,
- odpowiedzi tkanki mózgdzku na przeprowadzoną resekcję guza,
- odpowiedzi tkanki mózgdzku na zastosowanie chemioterapii,
- stopnia złośliwości nowotworu.

Możliwe jest również bezpośrednie porównanie profili metabolicznych dla obu analizowanych lokalizacji anatomicznych oraz określanie efektów metabolicznych spowodowanych przez czynnik patologiczny oraz terapeutyczny na podstawie analizy metabonomicznej obszaru odległego od krawędzi łoży pooperacyjnej lub guza.

Przeprowadzona także została automatyczna klasyfikacja widm ^1H MRS z wykorzystaniem sztucznych sieci neuronowych (perceptron wielowarstwowy). Wymiar danych wejściowych został zredukowany za pomocą PCA oraz algorytmu BFS, średnia jakość klasyfikacji dla sześciu najlepszych sieci MLP wynosi 89% i uzyskana została dla zewnętrznego zbioru testowego, którego przypadki były wyłączone z uczenia sieci.

Według wiedzy autora jest to pierwsza praca opisująca w sposób tak obszerny zastosowanie podejścia metabonomicznego do widm ^1H MRS *in vivo*.

9 Załącznik

Tabela 9.1 Zestawienie przesunięć chemicznych oraz multipletowości sygnałów dla neurometabolitów widocznych w spektroskopii protonowej „zdrowego” mózgu.

Nazwa	Średnie stężenie [mmol/litr]	Grupa	Przesunięcie chemiczne [ppm]	Multipletowość
Alanina	0,1-1,5	² CH	3,775	q
		³ CH ₃	1,467	d
Asparaginian	1,0-2,0	² CH	3,891	dd
		³ CH ₂	2,801	dd
			2,653	dd
Bursztynian	0,0-0,5	CH ₂	2,394	s
Cholina (tCho)	0,5-2,5	(CH ₃) ₃	3,185	s
		¹ CH ₂	4,054	m
		² CH ₂	3,501	m
Etanolamina	0,0-1,5	¹ CH ₂	3,818	m
		² CH ₂	3,147	m
Fosfokreatyna	3,0-5,5	CH ₃	3,029	s
		² CH ₂	3,930	s
		NH	6,58	s
		NH	7,30	s
GABA	1,0-2,0	² CH ₂	2,283	t
		³ CH ₂	1,889	m
		⁴ CH ₂	3,012	t
Glicyna	0,2-1,0	² CH ₂	3,547	s
Glukoza	1,0-2,0			
		anomer α		
		¹ CH	5,216	d
		² CH	3,519	dd
		³ CH	3,698	dd
		⁴ CH	3,395	dd
		⁵ CH	3,822	m
		⁶ CH	3,826	dd
		⁶ CH	3,749	dd
		anomer β		
		¹ CH	4,630	d
		² CH	3,230	dd
		³ CH	3,473	dd
		⁴ CH	3,387	dd
		⁵ CH	3,450	m

		^6CH	3,882	dd
		^6CH	3,707	dd
Glutamina	3,0-6,0	^2CH	3,757	dd
		$^3\text{CH}_2$	2,135	m
			2,115	
		$^4\text{CH}_2$	2,434	m
			2,456	
Glutaminian	6,0-12,5	^2CH	3,746	dd
		$^3\text{CH}_2$	2,042	m
			2,120	
		$^4\text{CH}_2$	2,336	m
			2,352	
Glutation	1,5-3,0	$^{10}\text{CH}_2$	3,769	s
część glicynowa		^7CH	4,561	dd
część cysteinowa		$^7\text{CH}_2$	2,926	dd
			2,975	dd
część glutaminianowa		^2CH	3,769	dd
		$^3\text{CH}_2$	2,159	m
			2,146	
		$^4\text{CH}_2$	2,434	m
			2,456	
Homokarnozyna	0,1-0,4	$^{\alpha}\text{CH}$	4,467	dd
		$^{\beta}\text{CH}_2$	3,191	dd
Kreatyna	4,5-10,5	CH_3	3,027	s
		CH_2	3,913	s
		NH	6,650	s
Kwas askorbinowy	0,5-1,5	^4CH	4,492	d
		^5CH	4,002	m
		$^6\text{CH}_2$	3,743	dd
			3,716	dd
Mleczan	0,2-1,0	^2CH	4,097	q
		$^3\text{CH}_3$	1,313	d
Mio-inozytol	4,0-9,0	^1CH	3,522	dd
		^2CH	4,054	dd
		^3CH	3,522	dd
		^4CH	3,614	dd
		^5CH	3,269	dd
		^6CH	3,614	dd
NAA	7,5-17,0			
część acetylowa		$^2\text{CH}_3$	2,008	s

część asparaginowa		^2CH	4,382	m
		$^3\text{CH}_2$	2,673	dd
			2,486	dd
		NH	7,820	d
NAAG	0,5-2,5			
część acetylowa		$^2\text{CH}_3$	2,042	s
część asparaginowa		^2CH	4,607	dd
		$^3\text{CH}_2$	2,721	dd
			2,519	dd
część glutaminianowa		^2CH	4,128	dd
		$^3\text{CH}_2$	1,881	m
			2,049	m
		$^4\text{CH}_2$	2,190	m
			2,180	m
Octan	0,0-0,5	$^2\text{CH}_3$	1,904	s
Phosphorylcholine	0,2-1,0	$(\text{CH}_3)_3$	3,209	s
		$^1\text{CH}_2$	4,282	m
		$^2\text{CH}_2$	3,643	m
Phosphorylethanolamine	1,0-2,0	$^1\text{CH}_2$	3,977	m
		$^2\text{CH}_2$	3,216	m
Pirogronian	0,0-0,5	$^4\text{CH}_3$	2,358	s
Seryna	0,2-2,0	CH	3,835	dd
		$^3\text{CH}_2$	3,937	dd
			3,976	dd
Tauryna	2,0-6,0	$^1\text{CH}_2$	3,420	dd
		$^2\text{CH}_2$	3,246	dd
Treonina	0,0-0,5	^2CH	3,578	d
		^3CH	4,246	m
		$^4\text{CH}_3$	1,316	d

Dane opracowane na podstawie książki [de Graaf 2007].

s – singlet, d – dublet, dd – dublet dubletów, q – kwartet, m – multiplet;

indeks górny – numer grupy wodorowej.

10 Bibliografia

[**Ackerman 1980**] Ackerman JJ, Grove TH, Wong GG, Gadian DG, Radda GK. Mapping of metabolites in whole animals by ^{31}P NMR using surface coils. *Nature*. 10;283(5743):167-70 (1980).

[**Al-Qadiri 2008**] Al-Qadiri HM, Lin M, Al-Holy MA, Cavinato AG, Rasco BA. Monitoring quality loss of pasteurized skim milk using visible and short wavelength near-infrared spectroscopy and multivariate analysis. *J Dairy Sci*. 91(3):950-8 (2008).

[**Andres 2008**] Andres RH, Ducray AD, Schlattner U, Wallimann T, Widmer HR. Functions and effects of creatine in the central nervous system. *Brain Res Bull*. 1;76(4):329-43 (2008).

[**Antti 2004**] Antti H, Ebbels TMD, Keun HC, Bollard ME, Beckonert O, Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E. Statistical experimental design and partial least squares regression analysis of biofluid metabonomic NMR and clinical chemistry data for screening of adverse drug effects. *Chemom Intell Lab Sys*. 73(1):139-49 (2004).

[**Barker 1993**] Barker PB, Soher BJ, Blackband SJ, Chatham JC, Mathews VP, Bryan RN. Quantitation of proton NMR spectra of the human brain using tissue water as an internal concentration reference. *NMR Biomed*. 6(1):89-94 (1993).

[**Barker 2003**] Barker M, Rayens W. Partial least squares for discrimination. *J Chemometrics*. 17:166-173 (2003).

[**Beckonert 2003**] Beckonert O, Bollard ME, Ebbels TMD, Keun HC, Antti H, Holmes E, Lindon JC, Nicholson JK. NMR-based metabonomic toxicity classification: hierarchical cluster analysis and k-nearest-neighbour approaches. *Anal Chim Act*. 490(1):3-15(13) (2003).

[**Behar 1983**] Behar KL, den Hollander JA, Stromski ME, Ogino T, Shulman RG, Petroff OA, Prichard JW. High-resolution ^1H nuclear magnetic resonance study of cerebral hypoxia in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 80(16):4945-8 (1983).

[**Bezabeh 2005**] Bezabeh T, Odlum O, Nason R, Kerr P, Sutherland D, Patel R, Smith IC. Prediction of treatment response in head and neck cancer by magnetic resonance spectroscopy. *AJNR Am J Neuroradiol*. 26(8):2108-13 (2005).

[**Bianchi 2003**] Bianchi MC, Tosetti M, Battini R, Manca ML, Mancuso M, Cioni G, Canapicchi R, Siciliano G. Proton MR Spectroscopy of Mitochondrial Diseases: Analysis

of Brain Metabolic Abnormalities and Their Possible Diagnostic Relevance. *AJNR Am J Neuroradiol.* 24(10):1958-66 (2003).

[Bishop 1995] Bishop CM. Neural Networks for Pattern Recognition. Oxford University Press, Inc. New York, NY, USA (1995).

[Blanco 2007] Blanco M, Alcalá M, Planells J, Mulero R. Quality control of cosmetic mixtures by NIR spectroscopy. *Anal Bioanal Chem.* 389(5):1577-83 (2007).

[Bloch 1946] Bloch F, Hansen WW, Packard ME, Nuclear Induction. *Phys Rev.* 69, 680 (1946).

[Bolton 2002] Bolton RJ, Hand DJ. Statistical fraud detection: A review. *Stat Sci.* 17:235–55 (2002).

[Bottomley 1985] Bottomley PA, Edelstein WA, Foster TH, Adams WA. In vivo solvent-suppressed localized hydrogen nuclear magnetic resonance spectroscopy: a window to metabolism? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82(7):2148–52 (1985).

[Bottomley 1987] Bottomley PA. Spatial localization in NMR-spectroscopy in vivo. *Ann N Y Acad Sci.* 508:333-48 (1987).

[Brown 1995] Brown MS, Simon JH, Stemmer SM, Stears JC, Scherzinger A, Cagnoni PJ, Jones RB. MR and Proton Spectroscopy of White Matter Disease Induced by High-Dose Chemotherapy with Bone Marrow Transplant in Advanced Breast Carcinoma. *AJNR Am J Neuroradiol.* 16(10):2013-20 (1995).

[Callot 2008] Callot V, Galanaud D, Le Fur Y, Confort-Gouny S, Ranjeva JP, Cozzzone PJ. 1H MR spectroscopy of human brain tumours: a practical approach. *Eur J Radiol.* 67(2):268-74 (2008).

[Castillo 2000] Castillo M, Smith JK, Kwock L. Correlation of myo-inositol levels and grading of cerebral astrocytomas. *AJNR Am J Neuroradiol.* 21(9):1645-9 (2000).

[Cattell 1966] Cattell RB. The scree test for the number of factors. *Multivariate Behav Res.* 1:629-637 (1966).

[Cecil 2001] Cecil KM, Jones BV. Magnetic resonance spectroscopy of the pediatric brain. *Top Magn Reson Imaging.* 12(6):435-52 (2001).

[Choi 2001] Choi CG, Yoo HW, Localized Proton MR Spectroscopy in Infants with Urea Cycle Defect. *AJNR Am J Neuroradiol.* 22(5):834-7 (2001).

[Chong 1999] Chong VF, Rumpel H, Aw YS, Ho GL, Fan YF, Chua EJ. Temporal lobe necrosis following radiation therapy for nasopharyngeal carcinoma: 1H MR spectroscopic findings. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 45(3):699-705 (1999).

- [Chan 2004]** Chan Y, Yeung D, Leong S, Lee F. Glutamate/glutamine complex, myoinositol and lipid in late radiation-induced injury of the brain: An in vivo ¹H MRS study. *Proc Intl Soc Mag Reson Med*. 11:2079 (2004).
- [Chen 2006]** Chen J, Huang SL, Li T, Chen XL. In vivo research in astrocytoma cell proliferation with ¹H-magnetic resonance spectroscopy: correlation with histopathology and immunohistochemistry. *Neuroradiology*. 48(5):312-8 (2006).
- [Chu 2003]** Chu WC, Chik KW, Chan YL, Yeung DK, Roebuck DJ, Howard RG, Li CK, Metreweli C. White matter and cerebral metabolite changes in children undergoing treatment for acute lymphoblastic leukemia: longitudinal study with MR imaging and ¹H MR spectroscopy. *Radiology* 229:659-69 (2003).
- [Constantinou 2005]** Constantinou MA, Papakonstantinou E, Spraul M, Sevastiadou S, Costalos C, Koupparis MA, Shulpis K, Tsantili-Kakoulidou A, Mikros E. ¹H NMR-based metabonomics for the diagnosis of inborn errors of metabolism in urine. *Anal Chim Act*. 542(2):169-77 (2005).
- [Costa 2002]** Costa MOR, Lacerda MTC, Otaduy MCG, Matsushita H, Cerri GG, Leite CC. Perfusion-MR and ¹H MRS of posterior fossa tumours:assessment of 9 cases. *J Neuroradiol*. 29:215-18 (2002).
- [Daikhin 2000]** Daikhin Y, Yudkoff M. Compartmentation of Brain Glutamate Metabolism in Neurons and Glial. *J Nutr*. 130:1026S–31S (2000).
- [Devos 2004]** Devos A, Lukas L, Suykens JAK, Vanhamme L, Tate AR, Howe FA, Majos C, Moreno-Torres A, van der Graaf M, Arus C, Van Huffel S. Classification of brain tumours using short echo time ¹H MR spectra. *J Magn Reson*. 170(1):164-175 (2004).
- [Dezortova 1999]** Dezortová M, Hájek M, Cáp F, Babis M, Tichý M, Vymazal J. Comparison of MR spectroscopy and MR imaging with contrast agent in children with cerebral astrocytomas. *Childs Nerv Syst*. 15(8):408-12 (1999).
- [Dezortova 2008]** Dezortova M, Hajek M. ¹H MR spectroscopy in pediatrics. *Eur J Radiol*. 67(2):240-9 (2008).
- [De Graaf 2007]** De Graaf RA. In vivo NMR Spectroscopy – 2nd Edition: Principles and Techniques. Chichester, West Sussex, England: John Wiley & Sons (2007).
- [del Mar Matarín 2007]** del Mar Matarín M, Pueyo R, Poca MA, Falcón C, Mataró M, Bargalló N, Sahuquillo J, Junqué C. Post-surgical changes in brain metabolism detected by magnetic resonance spectroscopy in normal pressure hydrocephalus: results of a pilot study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 78(7):760-3 (2007).

- [Doelken 2008]** Doelken MT, Stefan H, Pauli E, Stadlbauer A, Struffert T, Engelhorn T, Richter G, Ganslandt O, Doerfler A, Hammen T. (1)H-MRS profile in MRI positive-versus MRI negative patients with temporal lobe epilepsy. *Seizure*. 17(6):490-7 (2008).
- [Dowling 2001]** Dowling C, Bollen AW, Noworolski SM, McDermott MW, Barbaro NM, Day MR, Henry RG, Chang SM, Dillon WP, Nelson SJ, Vigneron DB. Preoperative proton MR spectroscopic imaging of brain tumors: correlation with histopathologic analysis of resection specimens. *AJNR Am J Neuroradiol*. 22(4):604-12 (2001).
- [Durazzo 2004]** Durazzo TC, Gałdziński S, Banys P, Meyerhoff DJ. Cigarette smoking exacerbates chronic alcohol-induced brain damage: a preliminary metabolite imaging study. *Alcohol Clin Exp Res*. 28(12):1849-60 (2004).
- [Erdem 2008]** Erdem A, Çilingiroğlu A, Giakoumaki A, Castanys M, Kartsonaki E, Fotakis C, Anglos D. Characterization of Iron age pottery from eastern Turkey by laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS). *J Arch Sci*. 35(9):2486-94 (2008).
- [Ernst 1966]** Ernst RR, Anderson WA. Application of Fourier Transform Spectroscopy to Magnetic Resonance. *Rev Sci Instrum*. 37, 93 (1966).
- [Ernst 2002]** Ernst T, Chang L, Cooray D, Salvador C, Jovicich J, Walot I, Boone K, Chlebowski R. The effects of tamoxifen and estrogen on brain metabolism in elderly women. *J Natl Cancer Inst*. 17;94(8):592-7 (2002).
- [Fan 2004]** Fan G, Sun B, Wu Z, Guo Q, Guo Y. In vivo single-voxel proton MR spectroscopy in the differentiation of high-grade gliomas and solitary metastases. *Clin Radiol*. 59(1):77-85 (2004).
- [Fang 2005]** Fang X, Luo H, Tang J. Structural damage detection using neural network with learning rate improvement. *Comp Struct*. 83;25-26:2150-61 (2005).
- [Fayed 2008]** Fayed N, Dávila J, Medrano J, Olmos S. Malignancy assessment of brain tumours with magnetic resonance spectroscopy and dynamic susceptibility contrast MRI. *Eur J Radiol*. 67(3):427-33 (2008).
- [Felipo 2006]** Felipo V. Contribution of altered signal transduction associated to glutamate receptors in brain to the neurological alterations of hepatic encephalopathy. *World J Gastroenterol*. 28;12(48):7737-43 (2006).
- [Firbank 2002]** Firbank MJ, Harrison RM, O'Brien JT. A Comprehensive Review of Proton Magnetic Resonance Spectroscopy Studies in Dementia and Parkinson's Disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 14:64-76 (2002).

- [Fountans 2004]** Fountas KN, Kapsalaki EZ, Vogel RL, Fezoulidis I, Robinson JS, Gotsis ED. Noninvasive histologic grading of solid astrocytomas using proton magnetic resonance spectroscopy. *Stereotact Funct Neurosurg.* 82(2-3):90-7 (2004).
- [Frahm 1989]** Frahm J, Bruhn H, Gyngell ML, Merboldt KD, Hänicke W, Sauter R. Localized proton NMR spectroscopy in different regions of the human brain in vivo. Relaxation times and concentrations of cerebral metabolites. *Magn Reson Med.* 11(1):47-63 (1989).
- [Gao 2008]** Gao H, Dong B, Liu X, Xuan H, Huang Y, Lin D. Metabonomic profiling of renal cell carcinoma: high-resolution proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of human serum with multivariate data analysis. *Anal Chim Acta.* 29;624(2):269-77 (2008).
- [Garcia 1997]** Garcia MA, Marti V, Meinhardt E, Cortina JL, Granados M. Metal cyanide control in hydrometallurgical processing of gold ores by multivariate calibration procedures. *Anal Chim Acta.* 353(1):123-131(9) (1997).
- [García-Gómez 2009]** García-Gómez JM, Luts J, Julià-Sapé M, Krooshof P, Tortajada S, Robledo JV, Melssen W, Fuster-García E, Olier I, Postma G, Monleón D, Moreno-Torres A, Pujol J, Candiota AP, Martínez-Bisbal MC, Suykens J, Buydens L, Celda B, Van Huffel S, Arús C, Robles M. Multiproject-multicenter evaluation of automatic brain tumor classification by magnetic resonance spectroscopy. *MAGMA.* 22(1):5-18 (2009).
- [Giese 2003]** Giese A, Bjerkvig R, Berens ME, Westphal M. Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment. *J Clin Oncol.* 15;21(8):1624-36 (2003).
- [Gong 2004]** Gong QY, Eldridge PR, Brodbelt AR, García-Fiñana M, Zaman A, Jones B, Roberts N. Quantification of tumour response to radiotherapy. *Br J Radiol.* 77(917):405-13 (2004).
- [Gordon 1980]** Gordon RE, Hanley PR, Shaw D, Gadian DG, Radda GK, Styles P, Bore PJ, Chan L. Localization of metabolites in animals using ^{31}P topical magnetic resonance. *Nature* 287, 736-8 (1980).
- [Grand 1999]** Grand S, Passaro G, Ziegler A, Estève F, Boujet C, Hoffmann D, Rubin C, Segebarth C, Décorps M, Le Bas JF, Rémy C. Necrotic tumor versus brain abscess: importance of amino acids detected at ^1H MR spectroscopy--initial results. *Radiology.* 213(3):785-93 (1999).
- [Gujar 2005]** Gujar SK, Maheshwari S, Björkman-Burtscher I, Sundgren PC. Magnetic resonance spectroscopy. *J Neuroophthalmol.* 25(3):217-26 (2005).

- [Haase 1985]** Haase A, Frahm J, Haenicke W, Matthei D. ^1H NMR chemical shift selective (CHESS) imaging. *Phys Med Biol.* 30:341-344 (1985).
- [Haken 1998]** Haken H, Wolf HC. Fizyka molekularna z elementami chemii kwantowej. *Wydawnictwo Naukowe PWN*. Warszawa (1998).
- [Hakumäki 2000]** Hakumäki JM, Kauppinen RA. ^1H NMR visible lipids in the life and death of cells. *Trends Biochem Sci.* 25(8):357-62 (2000).
- [Hammen 2002]** Hammen T, Stefan H, Tomandl B, The role of clinical in vivo ^1H -MR spectroscopy in the evaluation of epilepsies. *Spectroscopy* 16:297-306 (2002).
- [Harris 2007]** Harris LM, Davies N, Macpherson L, Foster K, Lateef S, Natarajan K, Sgouros S, Brundler MA, Arvanitis TN, Grundy RG, Peet AC. The use of short-echo-time ^1H MRS for childhood cerebellar tumours prior to histopathological diagnosis. *Pediatr Radiol.* 37(11):1101-9 (2007).
- [Hayashi 2003]** Hayashi T, Kumabe T, Jokura H, Fujihara K, Shiga Y, Watanabe M, Higano S, Shirane R. Inflammatory demyelinating disease mimicking malignant glioma. *J Nucl Med.* 44(4):565-9 (2003).
- [Heijne 2005]** Heijne WH, Jonker D, Stierum RH, van Ommen B, Groten JP. Toxicogenomic analysis of gene expression changes in rat liver after a 28-day oral benzene exposure. *Mutat Res.* 4;575(1-2):85-101 (2005).
- [Hennig 1992]** Hennig J, Pfister H, Ernst T, Ott D. Direct absolute quantification of metabolites in the human brain with in vivo localized proton spectroscopy. *NMR Biomed.* 5(4):193-9 (1992).
- [Heper 2005]** Heper AO, Erden E, Savas A, Ceyhan K, Erden I, Akyar S, Kanpolat Y. An analysis of stereotactic biopsy of brain tumors and nonneoplastic lesions: a prospective clinicopathologic study. *Surg Neurol.* 64 Suppl 2:82-8 (2005).
- [Herminghaus 2002]** Herminghaus S, Pilatus U, Möller-Hartmann W, Raab P, Lanfermann H, Schlote W, Zanella FE. Increased choline levels coincide with enhanced proliferative activity of human neuroepithelial brain tumors. *NMR Biomed.* 15(6):385-92 (2002).
- [Hotelling 1947]** Hotelling H. Multivariate Quality Control Illustrated by Air Testing of Sample Bombsights. Rozdział w: *Techniques of Statistical Analysis*. Edytorzy: Eisenhart C, Hastay MW, Wallis WA. McGraw-Hill. New York, USA, 111-84 (1947).
- [Howe 2003]** Howe FA, Barton SJ, Cudlip SA, Stubbs M, Saunders DE, Murphy M, Wilkins P, Opstad KS, Doyle VL, McLean MA, Bell BA, Griffiths JR. Metabolic profiles

- of human brain tumors using quantitative in vivo ¹H magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Med.* 49(2):223-32 (2003).
- [Huang 2008]** Huang K. Podstawy fizyki statystycznej. *Wydawnictwo Naukowe PWN*. Warszawa (2006).
- [Hunter 2000]** Hunter A. Feature Selection Using Probabilistic Neural Networks. *Neural Comput & Applic.* 9;2:124-32 (2000).
- [Imamura 2003]** Imamura K. Proton MR Spectroscopy of the Brain with a Focus on Chemical Issues. *Magn Reson Med Sci.* 1;2(3):117-132 (2003).
- [Isobe 2002]** Isobe T, Matsumura A, Anno I, Yoshizawa T, Nagatomo Y, Itai Y, Nose T. Quantification of cerebral metabolites in glioma patients with proton MR spectroscopy using T2 relaxation time correction. *Magn Reson Imaging.* 20(4):343-9 (2002).
- [Isobe 2010]** Isobe T, Yamamoto T, Akutsu H, Anno I, Shiigai M, Zaboronok A, Masumoto T, Takano S, Matsumura A. Proton magnetic resonance spectroscopy findings of hemangioblastoma. *Jpn J Radiol.* 28(4):318-21 (2010).
- [Jeun 2005]** Jeun SS, Kim MC, Kim BS, Lee JM, Chung ST, Oh CH, Lee SY, Choe BY. Assessment of malignancy in gliomas by 3T ¹H MR spectroscopy. *Clin Imaging.* 29(1):10-5 (2005).
- [Jolliffe 2002]** Jolliffe IT. Principal component analysis – 2nd Edition. New York, USA: Springer-Verlag (2002).
- [Jørgensen 2008]** Jørgensen K, Næs T. The use of LS-PLS for improved understanding, monitoring and prediction of cheese processing. *Chemom Intell Lab Sys.* 93(1):11-19 (2008).
- [Kamada 1994]** Kamada K, Houkin K, Hida K, Matsuzawa H, Iwasaki Y, Abe H, Nakada T. Localized proton spectroscopy of focal brain pathology in humans: significant effects of edema on spin-spin relaxation time. *Magn Reson Med.* 31(5):537-40 (1994).
- [Kamada 1997]** Kamada K, Houkin K, Abe H, Sawamura Y, Kashiwaba T. Differentiation of cerebral radiation necrosis from tumor recurrence by proton magnetic resonance spectroscopy. *Neurol Med Chir.* 37(3):250-6 (1997).
- [Kaiser 1960]** Kaiser HF. The application of electronic computers to factor analysis. *Edu Psych Measurement.* 20:141-151 (1960).
- [Kantarci 2007]** Kantarci K, Weigand SD, Petersen RC, Boeve BF, Knopman DS, Gunter J, Reyes D, Shiung M, O'Brien PC, Smith GE, Ivnik RJ, Tangalos EG, Jack CR Jr. Longitudinal ¹H MRS changes in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 28(9):1330-9 (2007).

- [Kekkonen 2008]** Kekkonen RA, Sysi-Aho M, Seppanen-Laakso T, Julkunen I, Vapaatalo H, Oresic M, Korpela R. Effect of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG intervention on global serum lipidomic profiles in healthy adults. *World J Gastroenterol.* 28;14(20):3188-94 (2008).
- [Kim 2008]** Kim SJ, Lyoo IK, Lee YS, Sung YH, Kim HJ, Kim JH, Kim KH, Jeong DU. Increased GABA levels in medial prefrontal cortex of young adults with narcolepsy. *Sleep.* 31(3):342-7 (2008).
- [Kizu 1998]** Kizu O, Naruse S, Furuya S, Morishita H, Ide M, Maeda T, Ueda S. Application of proton chemical shift imaging in monitoring of gamma knife radiosurgery on brain tumors. *Magn Reson Imaging.* 16(2):197-204 (1998).
- [Klein 2000]** Klein J. Membrane breakdown in acute and chronic neurodegeneration: focus on choline-containing phospholipids. *J Neural Transm.* 107(8-9):1027-63 (2000).
- [Klose 2008]** Klose U. Measurement sequences for single voxel proton MR spectroscopy. *Eur J Radiol.* 67(2):194-201 (2008).
- [Kochhar 2006]** Kochhar S, Jacobs DM, Ramadan Z, Berruex F, Fuerholz A, Fay LB. Probing gender-specific metabolism differences in humans by nuclear magnetic resonance-based metabolomics. *Anal Biochem.* 15;352(2):274-81 (2006).
- [Kreis 1996]** Kreis R, Arcinue E, Ernst T, Shonk TK, Flores R, Ross BD. Hypoxic encephalopathy after near-drowning studied by quantitative ¹H-magnetic resonance spectroscopy. *J Clin Invest.* 1;97(5): 1142–1154 (1996).
- [Kulak 2007]** Kulak W, Sobaniec W. Magnetic resonance imaging of the cerebellum and brain stem in children with cerebral palsy. *Adv Med Sci.* 52 Suppl 1:180-2 (2007).
- [Kumpulainen 2008]** Kumpulainen P, Hätönen K. Local anomaly detection for mobile network monitoring. *Inf Sci.* 178(20):3840-3859 (2008).
- [Kwock 2006]** Kwock L, Smith JK, Castillo M, Ewend MG, Collichio F, Morris DE, Bouldin TW, Cush S. Clinical role of proton magnetic resonance spectroscopy in oncology: brain, breast, and prostate cancer. *Lancet Oncol.* 7(10):859-68 (2006).
- [Lai 2002]** Lai PH, Ho JT, Chen WL, Hsu SS, Wang JS, Pan HB, Yang CF. Brain abscess and necrotic brain tumor: discrimination with proton MR spectroscopy and diffusion-weighted imaging. *AJNR Am J Neuroradiol.* 23(8):1369-77 (2002).
- [Lamers 2005]** Lamers RJ, van Nesselrooij JH, Kraus VB, Jordan JM, Renner JB, Dragomir AD, Luta G, van der Greef J, DeGroot J. Identification of an urinary metabolite profile associated with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 13(9):762-8 (2005).

- [**Lavine 2000**] Lavine BR. Clustering and Classification of Analytical Data. Rozdział w *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Edytor: Myers RA. v. 11, Wiley and Sons: Chichester, UK, 9689-9710 (2000).
- [**Law 2003**] Law M, Yang S, Wang H, Babb JS, Johnson G, Cha S, Knopp EA, Zagzag D. Glioma grading: sensitivity, specificity, and predictive values of perfusion MR imaging and proton MR spectroscopic imaging compared with conventional MR imaging. *AJNR Am J Neuroradiol*. 24(10):1989-98 (2003).
- [**Lee 1998**] Lee DW, Chung H, Lee SP, Choi KW, Yeo HT, Kim O, Rhee JK, Kim J. Brain Tumors in Which Lactate and Lipid Have Been Detected: A Proton Magnetic Resonance Spectroscopy Study. *J Korean Neurosurg Soc*. 27:5-14 (1998).
- [**Lehnhardt 2005**] Lehnhardt FG, Bock C, Röhn G, Ernestus RI, Hoehn M. Metabolic differences between primary and recurrent human brain tumors: a ¹H NMR spectroscopic investigation. *NMR Biomed*. 18(6):371-82 (2005).
- [**Leray 1999**] Leray P, Gallinari P. Feature selection with neural networks. *Behaviormetrika*. 26(1):145-66 (1999).
- [**Li 2003**] Li BS, Wang H, Gonen O. Metabolite ratios to assumed stable creatine level may confound the quantification of proton brain MR spectroscopy. *Magn Reson Imaging*. 21(8):923-8 (2003).
- [**Li 2005**] Li X, Vigneron DB, Cha S, Graves EE, Crawford F, Chang SM, Nelson SJ. Relationship of MR-derived lactate, mobile lipids, and relative blood volume for gliomas in vivo. *AJNR Am J Neuroradiol*. 26(4):760-9 (2005).
- [**Lin 2001**] Lin A, Nguy CH, Shic F, Ross BD. Accumulation of methylsulfonylmethane in the human brain: identification by multinuclear magnetic resonance spectroscopy. *Toxicol Lett*. 15;123(2-3):169-77 (2001).
- [**Lindskog 2004**] Lindskog M, Spenger C, Jarvet J, Graslund A, Kogner P. Predicting resistance or response to chemotherapy by proton magnetic resonance spectroscopy in neuroblastoma. *J Natl Cancer Inst*. 96:1457-66 (2004).
- [**Lisboa 2008**] Lisboa PJG, Romero E, Vellido A, Julià-Sapé M, Arús C. Classification, Dimensionality Reduction, and Maximally Discriminatory Visualization of a Multicentre ¹H-MRS Database of Brain Tumors. ICMLA '08 Proceedings of the 2008 Seventh International Conference on Machine Learning and Applications. *IEEE Computer Society*. Washington, DC, USA (2008).
- [**Lohmann 1934**] Lohmann K. Enzymic disruption of creatinephosphoric acid; the chemistry of muscle contraction. *Biochem Zeits*. 271, 264-77 (1934).

- [Luft 1999]** Luft AR, Skalej M, Schulz JB, Welte D, Kolb R, Bürk K, Klockgether T, Voight K. Patterns of age-related shrinkage in cerebellum and brainstem observed in vivo using three-dimensional MRI volumetry. *Cereb Cortex*. 9(7):712-21 (1999).
- [Lukas 2004]** Lukas L, Devos A, Suykens JA, Vanhamme L, Howe FA, Majós C, Moreno-Torres A, Van der Graaf M, Tate AR, Arús C, Van Huffel S. Brain tumor classification based on long echo proton MRS signals. *Artif Intell Med*. 31(1):73-89 (2004).
- [Mader 2008]** Mader I, Rauer S, Gall P, Klose U. (1)H MR spectroscopy of inflammation, infection and ischemia of the brain. *Eur J Radiol*. 67(2):250-257 (2008).
- [Marengo 2005]** Marengo E, Aceto M, Robotti E, Liparota MC, Bobba M, Pantò G. Archaeometric next term characterisation of ancient pottery belonging to the archaeological site of Novalesa Abbey (Piedmont, Italy) by ICP-MS and spectroscopic techniques coupled to multivariate statistical tools. *Anal Chim Acta*. 537(1-2):359-75 (2005).
- [Masters 1993]** Masters T. Practical neural network recipes in C++. *New York: Academic Press*. (1993).
- [Matulewicz 2006]** Matulewicz Ł, Sokół M, Wydmański J, Hawrylewicz L. Could lipid CH₂/CH₃ analysis by in vivo ¹H MRS help in differentiation of tumor recurrence and post-radiation effects? *Folia Neuropathol*. 44(2):116-124 (2006).
- [Matulewicz 2006b]** Matulewicz Ł, Sokół M, Michnik A, Wydmański J. Long-term normal-appearing brain tissue monitoring after irradiation using proton magnetic resonance spectroscopy in vivo: statistical analysis of a large group of patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1;66(3):825-32 (2006).
- [Maxwell 1998]** Maxwell RJ, Martínez-Pérez I, Cerdán S, Cabañas ME, Arús C, Moreno A, Capdevila A, Ferrer E, Bartomeus F, Aparicio A, Conesa G, Roda JM, Carceller F, Pascual JM, Howells SL, Mazucco R, Griffiths JR. Pattern recognition analysis of ¹H NMR spectra from perchloric acid extracts of human brain tumor biopsies. *Magn Reson Med*. 39(6):869-77 (1998).
- [Meyerand 1999]** Meyerand ME, Pipas JM, Mamourian A, Tosteson TD, Dunn JF. Classification of biopsy-confirmed brain tumors using single-voxel MR spectroscopy. *AJNR Am J Neuroradiol*. 20(1):117-23 (1999).
- [Michaelis 1993]** Michaelis T, Merboldt KD, Bruhn H, Hanicke W, Frahm J. Absolute concentrations of metabolites in the adult human brain in vivo: quantification of localized proton MR spectra. *Radiology* 187, 219-227 (1993).

- [**Michel 2006**] Michel V, Yuan Z, Ramsuvar S, Bakovic M. Choline transport for phospholipid synthesis. *Exp Biol Med (Maywood)*. 231(5):490-504 (2006).
- [**Moffett 2007**] Moffett JR, Ross B, Arun P, Madhavarao CN, Namboodiri AM. N-Acetylaspartate in the CNS: from neurodiagnostics to neurobiology. *Prog Neurobiol*. 81(2):89-131 (2007).
- [**Moonen 1989**] Moonen CT, von Kienlin M, van Zijl PC, Cohen J, Gillen J, Daly P, Wolf G. Comparison of single-shot localization methods (STEAM and PRESS) for in vivo proton NMR spectroscopy. *NMR Biomed*. 2(5-6):201-8 (1989).
- [**Moreira 1995**] Moreira M, Fiesler E. Neural networks with adaptive learning rate and momentum terms, *Technical Report 95-04, IDIAP*, Martigny, Switzerland (1995).
- [**Mullins 2005**] Mullins ME, Barest GD, Schaefer PW, Hochberg FH, Gonzalez RG, Lev MH. Radiation necrosis versus glioma recurrence: conventional MR imaging clues to diagnosis. *AJNR Am J Neuroradiol*. 26(8):1967-72 (2005).
- [**Murphy 2003**] Murphy PS, Rowland IJ, Viviers L, Brada M, Leach MO, Dzik-Jurasz AS. Could assessment of glioma methylene lipid resonance by in vivo (1)H-MRS be of clinical value? *Br J Radiol*. 76(907):459-63 (2003).
- [**Nicholson 1999**] Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. "Metabonomics": understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*. 11:1181-9 (1999).
- [**Negendank 1996**] Negendank WG, Sauter R, Brown TR, Evelhoch JL, Falini A, Gotsis ED, Heerschap A, Kamada K, Lee BC, Mengeot MM, Moser E, Padavic-Shaller KA, Sanders JA, Spraggins TA, Stillman AE, Terwey B, Vogl TJ, Wicklow K, Zimmerman RA. Proton magnetic resonance spectroscopy in patients with glial tumors: a multicenter study. *J Neurosurg*. 84(3):449-58 (1996).
- [**Odeblad 1956**] Odeblad E, Bhar BN, Lindstrom G. Proton magnetic resonance of human red blood cells in heavy-water exchange experiments. *Arch Biochem Biophys*. 63(1):221-5 (1956).
- [**Oh 2005**] Oh J, Cha S, Aiken AH, Han ET, Crane JC, Stainsby JA, Wright GA, Dillon WP, Nelson SJ. Quantitative apparent diffusion coefficients and T2 relaxation times in characterizing contrast enhancing brain tumors and regions of peritumoral edema. *J Magn Reson Imaging*. 21(6):701-8 (2005).
- [**Opstad 2007**] Opstad KS, Ladroue C, Bell BA, Griffiths JR, Howe FA. Linear discriminant analysis of brain tumour 1H MR spectra: a comparison of classification using whole spectra versus metabolite quantification. *NMR Biomed*. 20(8):763-70 (2007).

- [Ortega-Martorell 2010]** Ortega-Martorell S, Olier I, Julià-Sapé M, Arús C. SpectraClassifier 1.0: a user friendly, automated MRS-based classifier-development system. *BMC Bioinformatics*. 24;11:106 (2010).
- [Panigrahy 2006]** Panigrahy A, Krieger MD, Gonzalez-Gomez I, Liu X, McComb JG, Finlay JL, Nelson MD Jr, Gilles FH, Blüml S. Quantitative short echo time 1H-MR spectroscopy of untreated pediatric brain tumors: preoperative diagnosis and characterization. *AJNR Am J Neuroradiol*. 27(3):560-72 (2006).
- [Pearson 1901]** Pearson K. On Lines and Planes of Closest Fit to Systems of Points in Space. *Philos Mag*. 2(6):559–572 (1901). Artykuł dostępny na zasadzie domeny publicznej pod adresem: <http://stat.smmu.edu.cn/history/pearson1901.pdf>
- [Pérez-Ruiz 2010]** Pérez-Ruiz A, Julià-Sapé M, Mercadal G, Olier I, Majós C, Arús C. The INTERPRET Decision-Support System version 3.0 for evaluation of Magnetic Resonance Spectroscopy data from human brain tumours and other abnormal brain masses. *BMC Bioinformatics*. 29;11:581 (2010).
- [Petroff 1995]** Petroff OA, Pleban LA, Spencer DD. Symbiosis between in vivo and in vitro NMR spectroscopy: the creatine, N-acetylaspartate, glutamate, and GABA content of the epileptic human brain. *Magn Reson Imaging*. 13(8):1197-211 (1995).
- [Poptani 1999]** Poptani H, Kaartinen J, Gupta RK, Niemitz M, Hiltunen Y, Kauppinen RA. Diagnostic assessment of brain tumours and non-neoplastic brain disorders in vivo using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy and artificial neural networks. *J Cancer Res Clin Oncol*. 125(6):343-9 (1999).
- [Poulton 2001]** Poulton MM. Computational neural networks for geophysical data processing. *Pergamon*, New York, USA, 2001.
- [Pöllänen 2005]** Pöllänen K, Häkkinen A, Reinikainen SP, Rantanen J, Karjalainen M, Louhi-Kultanen M, Nyström L. IR spectroscopy together with multivariate data analysis as a process analytical tool for in-line monitoring of crystallization process and solid-state analysis of crystalline product. *J Pharm Biomed Anal*. 15;38(2):275-84 (2005).
- [Prassopoulos 1997]** Prassopoulos P, Cavouras D, Evlogias N, Golfopoulos S. Brain atrophy in children undergoing systemic chemotherapy for extracranial solid tumors. *Med Pediatr Oncol*. 28(3):228-33 (1997).
- [Proctor 1950]** Proctor WG, Yu FC. The Dependence of a Nuclear Magnetic Resonance Frequency upon Chemical Compound. *Phys Rev*. 77, 717 (1950).
- [Purcell 1946]** Purcell EM, Torrey HC, Pound RV, Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid, *Phys Rev*. 69, 37-8 (1946).

- [Rabi 1937]** Rabi II. Space Quantization in a Gyating Magnetic Field. *Phys Rev.* 51, 652-4 (1937).
- [Rabi 1938]** Rabi II, Zacharias JR, Millman S, Kusch P. A New Method of Measuring Nuclear Magnetic Moment. *Phys Rev.* 53, 318 (1938).
- [Rigotti 2007]** Rigotti DJ, Inglese M, Gonen O. Whole-brain N-acetylaspartate as a surrogate marker of neuronal damage in diffuse neurologic disorders. *AJNR Am J Neuroradiol.* 28(10):1843-9 (2007).
- [Robertson 2005]** Robertson DG, Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E. Metabonomics in Toxicity Assessment. *CRC Press*, Boca Raton USA (2005).
- [Roda 2000]** Roda JM, Pascual JM, Carceller F, González-Llanos F, Pérez-Higueras A, Solivera J, Barrios L, Cerdán S. Nonhistological diagnosis of human cerebral tumors by ¹H magnetic resonance spectroscopy and amino acid analysis. *Clin Cancer Res.* 6(10):3983-93 (2000).
- [Rojas 1996]** Rojas R. Neural Networks - A Systematic Introduction. New York, USA: Springer-Verlag (1996).
- [Rosenblatt 1958]** Rosenblatt F. The Perceptron: A probabilistic model for information storage and organization in the brain. *Psychol Rev.* 65:386-408 (1958).
- [Rosipal 2006]** Rosipal R, Krämer N. Overview and Recent Advances in Partial Least Squares. Rozdział w: *Subspace, Latent Structure and Feature Selection Techniques*. Edytorzy: Saunders C., Grobelnik M., Gunn S., Shawe-Taylor J. Springer, 34-51 (2006)
- [Ross 2001]** Ross B., Bluml S. Magnetic resonance spectroscopy of the human brain. *Anat Rec.* 265(2):54-84 (2001).
- [Roszkowski 2005]** Roszkowski K, Foksiński M. Wpływ promieniowania jonizującego na DNA komórki. *Wsp Onkol.* 9;7:284–86 (2005).
- [Rousseau 2008]** Rousseau R, Govaerts B, Verleysen M, Boulanger B. Comparison of some chemometric tools for metabonomics biomarker identification. *Chemom Intell Lab Sys.* 91:54–66 (2008).
- [Rovira 2002]** Rovira A, Pericot I, Alonso J, Rio J, Grivé E, Montalban X. Serial diffusion-weighted MR imaging and proton MR spectroscopy of acute large demyelinating brain lesions: case report. *AJNR Am J Neuroradiol.* 23(6):989-94 (2002).
- [Ruben 2006]** Ruben JD, Dally M, Bailey M, Smith R, McLean CA, Fedele P. Cerebral radiation necrosis: incidence, outcomes, and risk factors with emphasis on radiation parameters and chemotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1;65(2):499-508 (2006).

- [Rutkowski 2003]** Rutkowski T, Tarnawski R, Sokół M, Maciejewski B. 1H-MR spectroscopy of normal brain tissue before and after postoperative radiotherapy because of primary brain tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 56(5):1381-9 (2003).
- [Rayleigh 1870]** Lord Rayleigh (Strutt JW). On the Theory of Resonance. *Phil Trans.* 161:77-118 (1870).
- [Ryner 1998]** Ryner LN, Ke Y, Thomas MA. Flip angle effects in STEAM and PRESS-optimized versus sinc RF pulses. *J Magn Reson.* 131(1):118-25 (1998).
- [Salibi 1998]** Salibi N, Brown MA, Editors, Clinical MR Spectroscopy: First Principles. New York: Wiley-Liss, Inc. (1998).
- [Samadani 2006]** Samadani U, Stein S, Moonis G, Sonnad SS, Bonura P, Judy KD. Stereotactic biopsy of brain stem masses: Decision analysis and literature review. *Surg Neurol.* 66(5):484-91 (2006).
- [Sanacora 2002]** Sanacora G, Mason GF, Rothman DL, Krystal JH. Increased occipital cortex GABA concentrations in depressed patients after therapy with selective serotonin reuptake inhibitors. *Am J Psychiatry.* 159(4):663-5 (2002).
- [Schluter 2008]** Schluter C, Trede M. Identifying multiple outliers in heavy-tailed distributions with an application to market crashes. *J Emp Fin.* 15(4):700-13 (2008).
- [Selviaridis 2007]** Selviaridis P, Zountsas B, Chatzisotiriou A, Zaraboukas T, Gerdemeli A. Demyelinating plaque imitates an intramedullary tumour. *Clin Neurol Neurosurg.* 109(10):905-9 (2007).
- [Sharma 2000]** Sharma R, Yu H, Wolinsky J, Narayana P. Acetate Metabolism is Altered in Some Multiple Sclerosis Plaques. *Proc Intl Sot Mag Reson Med.* Ann. Meeting, Denver, CO, USA. 8:623 (2000).
- [Shlens 2005]** Shlens J. A Tutorial On Principal Component Analysis. <http://www.cs.cmu.edu/~elaw/papers/pca.pdf> (ostatni dostęp 27.10.2011).
- [Sibtain 2007]** Sibtain NA, Howe FA, Saunders DE. The clinical value of proton magnetic resonance spectroscopy in adult brain tumours. *Clin Radiol.* Clin Radiol. 62(2):109-19 (2007).
- [Simmons 1998]** Simmons A, Smail M, Moore E, Williams SC. Serial precision of metabolite peak area ratios and water referenced metabolite peak areas in proton MR spectroscopy of the human brain. *Magn Reson Imaging.* 16(3):319-30 (1998).
- [Sjøbakk 2007]** Sjøbakk TE, Johansen R, Bathen TF, Sonnewald U, Kvistad KA, Lundgren S, Gribbestad IS. Metabolic profiling of human brain metastases using in vivo proton MR spectroscopy at 3T. *BMC Cancer.* 7:141 (2007).

- [Sjöström 1986] Sjöström M, Wold S, Söderström B. PLS discriminant plots. Rozdział w: *Pattern Recognition in Practice II*. Edytorzy: Gelsema ES, Kanal LN. Elsevier, Amsterdam, 486 (1986).
- [Soher 2005] Soher BJ, Doraiswamy PM, Charles HC. A review of ¹H MR spectroscopy findings in Alzheimer's disease. *Neuroimaging Clin N Am*. 15(4):847-52 (2005).
- [Solov'ev 2006] Solov'ev SV. The weight and linear dimensions of the human cerebellum. *Neurosci Behav Physiol*. 36(5):479-81 (2006).
- [Stahle 1987] Stahle L, Wold S. Partial least squares analysis with cross-validation for the two-class problem: a Monte Carlo study. *J Chemometrics*. 1:185–196 (1987).
- [Stevenson 2004] Stevenson KL. Pediatric brain tumors. *J Neurosci*. 1:10-20 (2004).
- [Stoll 1995] Stoll AL, Renshaw PF, De Micheli E, Wurtman R, Pillay SS, Cohen BM. Choline ingestion increases the resonance of choline-containing compounds in human brain: an in vivo proton magnetic resonance study. *Biol Psychiatry*. 1;37(3):170-4 (1995).
- [Tadeusiewicz 1993] Tadeusiewicz R. Sieci neuronowe. *Akademicka Oficyna Wydawnicza RM*, Warszawa (1993).
- [Tanaka 1995] Tanaka K, Kikuchi Y, Yamada Y. Non-invasive monitoring of tissue response to radiotherapy by localised proton spin-lattice relaxation time in mice. *Med Biol Eng Comput*. 33(1):38-43 (1995).
- [Tang 2007] Tang J, Chen Z, Fu A, Cheung DW. Capabilities of outlier detection schemes in large datasets, framework and methodologies. *Knowl Inf Syst* 11(1): 45-84 (2007).
- [Tarachiwin 2007] Tarachiwin L, Ute K, Kobayashi A, Fukusaki E. ¹H NMR based metabolic profiling in the evaluation of Japanese green tea quality. *J Agric Food Chem*. 14;55(23):9330-6 (2007).
- [Tarasów 2003] Tarasów E, Panasiuk A, Siergiejczyk L, Orzechowska-Bobkiewicz A, Lewszuk A, Walecki J, Prokopowicz D. MR and ¹H MR spectroscopy of the brain in patients with liver cirrhosis and early stages of hepatic encephalopathy. *Hepatogastroenterology*. 50(54):2149-53 (2003).
- [Tarnawski 2002] Tarnawski R, Sokół M, Pieniążek P, Maciejewski B, Walecki J, Miszczyk L, Krupska T. ¹H-MRS in vivo predicts the early treatment outcome of postoperative radiotherapy for malignant gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 52(5):1271-6 (2002).

- [Tate 2003]** Tate AR, Majós C, Moreno A, Howe FA, Griffiths JR, Arús C. Automated classification of short echo time in in vivo ¹H brain tumor spectra: a multicenter study. *Magn Reson Med*. 49(1):29-36 (2003).
- [Tate 2006]** Tate AR, Underwood J, Acosta DM, Julià-Sapé M, Majós C, Moreno-Torres A, Howe FA, van der Graaf M, Lefournier V, Murphy MM, Loosemore A, Ladroue C, Wesseling P, Luc Bosson J, Cabañas ME, Simonetti AW, Gajewicz W, Calvar J, Capdevila A, Wilkins PR, Bell BA, Rémy C, Heerschap A, Watson D, Griffiths JR, Arús C. Development of a decision support system for diagnosis and grading of brain tumours using in vivo magnetic resonance single voxel spectra. *NMR Biomed*. 19:411-434 (2006).
- [Thanasoulis 2003]** Thanasoulis NC, Parisi NA, Evmiridis NP. Multivariate chemometrics for the forensic discrimination of blue ball-point pen inks based on their Vis spectra. *Forensic Sci Int*. 17;138(1-3):75-84 (2003).
- [Tzika 2002a]** Tzika AA, Cheng LL, Goumnerova L, Madsen JR, Zurakowski D, Astrakas LG, Zarifi MK, Scott RM, Anthony DC, Gonzalez RG, Black PM. Biochemical characterization of pediatric brain tumors by using in vivo and ex vivo magnetic resonance spectroscopy. *J Neurosurg*. 96(6):1023-31 (2002).
- [Tzika 2002b]** Tzika AA, Zarifi MK, Goumnerova L, Astrakas LG, Zurakowski D, Young-Poussaint T, Anthony DC, Scott RM, Black PM. Neuroimaging in pediatric brain tumors: Gd-DTPA-enhanced, hemodynamic, and diffusion MR imaging compared with MR spectroscopic imaging. *AJNR Am J Neuroradiol*. 23(2):322-33 (2002).
- [‘t Hart 2003]** ‘t Hart BA, Vogels JT, Spijksma G, Brok HP, Polman C, van der Greef J. ¹H-NMR spectroscopy combined with pattern recognition analysis reveals characteristic chemical patterns in urines of MS patients and non-human primates with MS-like disease. *J Neurol Sci*. 15;212(1-2):21-30 (2003).
- [Underwood 2006]** Underwood BR, Broadhurst D, Dunn WB, Ellis DI, Michell AW, Vacher C, Mosedale DE, Kell DB, Barker RA, Grainger DJ, Rubinsztein DC. Huntington disease patients and transgenic mice have similar pro-catabolic serum metabolite profiles. *Brain*. 129(Pt 4):877-86 (2006).
- [Vatsal 2002]** Vatsal DK, Husain M, Husain N, Chawla S, Roy R, Gupta RK. Cerebellar hemangioblastoma simulating arachnoid cyst on imaging and surgery. *Neurosurg Rev*. 25:107-9 (2002).
- [Waldrop 1998]** Waldrop SM, Davis PC, Padgett CA, Shapiro MB, Morris R. Treatment of brain tumors in children is associated with abnormal MR spectroscopic ratios in brain tissue remote from the tumor site. *AJNR Am J Neuroradiol*. 19:963-970 (1998).

- [Walecki 1999]** Walecki J, Sokół M, Pieniążek P, Maciejewski B, Tarnawski R, Krupska T, Wydmański J, Brzeziński J, Grieb P. Role of short TE 1H-MR spectroscopy in monitoring of post-operation irradiated patients. *Eur J Radiol.* 30:154-61 (1999).
- [Weber 1999]** Weber OM, Verhagen A, Duc CO, Meier D, Leenders KL, Boesiger P. Effects of vigabatrin intake on brain GABA activity as monitored by spectrally edited magnetic resonance spectroscopy and positron emission tomography. *Magn Reson Imaging.* 17(3):417-25 (1999).
- [Weiner 1980]** Weiner MW, Greene K, Vreman H, Wemmer D, Jardetsky NW, Jardetsky O. ³¹P NMR measurements of metabolites in organs of live animals using chronically implanted radiofrequency coils. *IRCS Med Sci.* 8:671 (1980).
- [Wold 1966]** Wold H. Estimation of principal components and related models by iterative least squares. Rozdział w *Multivariate Analysis*. Edytor: Krishnaiah PR. *New York: Academic Press*, 391-420 (1966).
- [Wold 1998]** Wold S, Antti H, Lindgren F, Öhman J. Orthogonal Signal Correction of Near-Infrared Spectra. *Chemom Intell Lab Sys.* 44:175-185 (1998).
- [Wold 2001]** Wold S, Sjöström M, Eriksson L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemom Intell Lab Sys.* 58(2):109-130 (2001).
- [Xu 2008]** Xu PB, Lin ZY, Meng HB, Yan SK, Yang Y, Liu XR, Li JB, Deng XM, Zhang WD. A metabonomic approach to early prognostic evaluation of experimental sepsis. *J Infect.* 56(6):474-81 (2008).
- [Young 2000]** Young G, Toretsky JA, Campbell AB, Eskenazi AE. Recognition of common childhood malignancies. *Am Fam Physician.* 61:2144-54 (2000).
- [Yu 1995]** Yu XH, Chen GA, Cheng SX. Dynamic learning rate optimization of the backpropagation algorithm. *IEEE Trans Neural Netw.* 6(3):669-77 (1995).
- [Zhu 2002]** Zhu PJ, Chiappinelli VA. Nicotinic receptors mediate increased GABA release in brain through a tetrodotoxin-insensitive mechanism during prolonged exposure to nicotine. *Neuroscience.* 115(1):137-44 (2002).

11 Spis rysunków

Rys. 2.1. Widmo ^1H <i>in vivo</i> MRS pochodzące od zdrowego ochotnika przedstawione w zakresie 0,2 – 4,0 ppm. Zarejestrowane w polu 2T przy następujących parametrach akwizycji: TE/TR/Acq = 35/1500/50	10
Rys. 4.1. Widmo ^1H MRS etanolu ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) zarejestrowane w polu 2T odpowiadającym częstotliwości rezonansowej protonów 81,3 MHz. Przesunięcie chemiczne równe 0 odpowiada sygnałowi substancji wzorcowej, natomiast rozdzielczość bezwymiarowej skali ppm odpowiada częstotliwości rezonansowej protonów w danym polu B_0 podzielonej przez 10^6 . Słabsza elektroujemność atomu węgla w porównaniu z atomem tlenu prowadzi do większego ekranowania diamagnetycznego protonów grup CH, w wyniku czego mniejsza jest częstotliwość rezonansowa tych protonów w porównaniu z protonami grupy OH	23
Rys. 4.2. Procedura określenia rozmiaru i lokalizacji objętości pomiarowej (tak zwanego woksela) z wykorzystaniem trzech impulsów o częstotliwości radiowej oraz pól gradientowych	25
Rys. 4.3. Porównanie technik PRESS (góra) i STEAM (dół). W technice PRESS generowane są dwa sygnały echa o częstotliwości radiowej (RF), pierwszy jest tłumiony przez specjalne gradientowe impulsy tłumiące i pomijany. Rejestracji podlega sygnał drugiego echa (z woksela wybranego przez impulsy 90o, 180o i 180o oraz sekwencje impulsów gradientowych Gz, Gx i Gy) formowany w czasie TE1 + TE2 określanym jako całkowity czas TE sekwencji PRESS. W technice STEAM generowanych jest pięć sygnałów echa, w tym cztery po ostatnim (trzecim) impulsie 90o. Rejestracji podlega sygnał stymulowanego echa formowany w czasie TE + TM	26
Rys. 5.1. Graficzne przedstawienie macierzowej transformacji PCA	28
Rys. 5.2. Wiersze macierzy X (widma) przedstawione jako zbiór punktów w n wymiarowej przestrzeni	29
Rys. 5.3. Rysunek a: Pierwsza składowa główna (PC1) jest linią, która w najlepszy sposób przybliża rozkład danych, co odpowiada kierunkowi największej wariancji danych. Druga składowa główna (PC2) odzwierciedla kierunek kolejnej co do wielkości wewnętrznej wariancji danych, zachowując prostopadłość względem PC1. Rysunek b: Dwie składowe główne tworzą płaszczyznę będącą oknem w n wymiarowej przestrzeni. Każde widmo może być rzutowane na tą płaszczyznę pozwalając na prezentację rozkładu widm w dwóch wymiarach	30
Rys. 5.4. Porównanie wykresów współrzędnych czynnikowych przypadków (a) i ładunków czynnikowych (b). Jeżeli widma pochodzą od dwóch różnych grup pacjentów i charakter różnic pomiędzy tymi widmami pokrywa się z kierunkiem wariancji wskazanym przez składowe główne, to dzięki metodzie PCA możliwe jest określenie, które widma należą do danej grupy oraz które przesunięcia chemiczne mają wpływ na zaobserwowane różnice	31
Rys. 5.5. Wykres osypiska wartości własnych macierzy kowariancji dla danych X. Dwadzieścia pierwszych składowych głównych ma wartości własne > 1, jednakże kształt krzywej sugeruje wykorzystanie jedynie sześciu pierwszych składowych głównych	32
Rys. 5.6. Wykres współrzędnych czynnikowych przypadków analizy PCA. Widma wyraźnie odstające są zaznaczone kolorem niebieskim; elipsa oznacza przedział ufności 95%	33

Rys. 5.7. Macierz danych X oraz macierz Y określająca przynależność widm do danej klasy	34
Rys. 5.8. Rysunek a: Dwie składowe główne tworzą płaszczyznę będącą oknem w n wymiarowej przestrzeni. Rysunek b: Składowe ukryte (LC) wyznaczają nowe kierunki na powyższej płaszczyźnie. Kierunek pierwszej składowej ukrytej dobierany jest tak, aby w jak największym stopniu odzwierciedlać korelację pomiędzy X i Y zachowując możliwie dużo informacji o wewnętrznej strukturze danych. Rysunek c: Rzut widm na płaszczyznę rozpiętą na składowych głównych (PCA) prowadzi do błędnej klasyfikacji niektórych przypadków (wewnętrzna wariancja danych nie pokrywa się z predefiniowaną informacją o przynależności do danej klasy). Rysunek d: Po rzutowaniu widm na płaszczyznę rozpiętą na składowych ukrytych (PLS-DA) brak jest przypadków o wyraźnie błędnej klasyfikacji	37
Rys. 5.9. Graficzne przedstawienie idei ortogonalnej korekcji sygnału (OSC)	40
Rys. 5.10. Schemat działania sztucznego neuronu	41
Rys. 5.11. Schemat sieci MLP 3:6:2	42
Rys. 5.12. Kształty obszarów decyzyjnych oraz graficzne przedstawienie możliwości klasyfikacyjnych sieci neuronowych w zależności od stopnia złożoności sieci. Sieci złożone z dwóch warstw ukrytych potrafią odwzorować skomplikowane regularności w zestawach danych	42
Rys. 5.13. Uproszczony schemat przebiegu procesu uczenia MLP opartego na algorytmie wstecznej propagacji błędów. Sygnał wejściowy jest przetwarzany przez neurony ukryte i dociera do neuronów wyjściowych. Następnie obliczany jest błąd popełniony przez każdy z neuronów wyjściowych, który w kolejnym kroku jest przetwarzany na błąd na wejściu neuronów wyjściowych. W tym momencie następuje wsteczna propagacja błędów na wejściu neuronu wyjściowego do neuronów warstwy ukrytej	46
Rys. 5.14. Wektor wagowy w zadaje w przestrzeni zmiennych wejściowych kierunek hiperpłaszczyzny decyzyjnej (wektor normalny do tej hiperpłaszczyzny), natomiast odległość tej hiperpłaszczyzny decyzyjnej od środka układu współrzędnych jest określona przez bias w_0	49
Rys. 7.1. Histogram przedstawiający liczbę widm uzyskanych w danym przedziale czasu od zakończenia radioterapii. Słupki w kolorze niebieskim przedstawia liczbę widm uzyskanych w czasie poniżej 90 dni od zakończenia radioterapii	55
Rys. 7.2. Wykresy współrzędnych czynnikowych przypadków dla t_1/t_2 (a) oraz t_2/t_3 (b) otrzymane z analizy PCA macierzy X_0 . Widma odstające oznaczono kolorem niebieskim	60
Rys. 7.3. Wykresy współrzędnych czynnikowych przypadków dla t_1/t_2 (a) oraz t_2/t_3 (b) otrzymane z analizy PCA macierzy X	61
Rys. 7.4. Porównanie testów T^2 Hotellinga dla modeli PCA macierzy X_0 (a) i X (b). Czerwona przerywana linia oznacza 99% przedział ufności, linia zielona oznacza 95% przedział ufności	62
Rys. 7.5. Porównanie rozkładów PCA danych macierzy X otrzymanych przy uwzględnieniu danych klinicznych. Rozróżnienie grup histopatologicznych (a), stan guza/prolifracja (b), wczesne/późne zmiany popromienne (c), operacja/brak operacji (d), chemioterapia/brak chemioterapii (e), stopień złośliwości (f), lokalizacja obszaru pomiarowego (g). No ID oznacza brak konkretnej informacji klinicznej	64
Rys. 7.6. Wykresy współrzędnych czynnikowych przypadków (a) oraz wag (b) modelu PLS-DA-1	69

Rys. 7.7. Wykresy współrzędnych czynnikowych przypadków (a) oraz wag (b) modelu OCS PLS-DA-1	70
Rys. 7.8. Wykresy współrzędnych czynnikowych przypadków (a) oraz wag (b) modelu OCS PLS-DA-2	71
Rys. 7.9. Wykresy współrzędnych czynnikowych przypadków (a) oraz wag (b) modelu PLS-DA-3	74
Rys. 7.10. Wykresy współrzędnych czynnikowych przypadków (a) oraz wag (b) modelu OSC PLS-DA-3	75
Rys. 7.11. Wykresy współrzędnych czynnikowych przypadków (a) oraz wag (b) modelu OSC PLS-DA-4	77
Rys. 7.12. Wykresy współrzędnych czynnikowych przypadków (a) oraz wag (b) modelu PLS-DA-5	78
Rys. 7.13. Wykresy współrzędnych czynnikowych przypadków (a) oraz wag (b) modelu OSC PLS-DA-5	79
Rys. 7.14. Wykresy współrzędnych czynnikowych przypadków (a) oraz wag (b) modelu OSC PLS-DA-6	81
Rys. 7.15. Wykresy współrzędnych czynnikowych przypadków (a) oraz wag (b) modelu PLS-DA-7	82
Rys. 7.16. Wykresy współrzędnych czynnikowych przypadków $t[1]/t[2]$ (a) i $t[2]/t[3]$ (c) oraz wag $w^*[1]/w^*[2]$ (b) i $w^*[2]/w^*[3]$ (d) modelu OSC PLS-DA-7	84
Rys. 7.17. Wykresy współrzędnych czynnikowych przypadków $t[1]/t[2]$ (a) i $t[1]$ (c) oraz wag $w^*[1]/w^*[2]$ (b) i $w^*[1]$ (d) modeli OSC PLS-DA-8-GR (a, b) i OSC PLS-DA-8-REF (c, d)	93
Rys. 7.18. Wykresy współrzędnych czynnikowych przypadków $t[1]$ (a) i $t[1]/t[2]$ (c) oraz wag $w^*[1]$ (b) i $w^*[1]/w^*[2]$ (d) modeli OSC PLS-DA-9-GR (a, b) i OSC PLS-DA-9-REF (c, d)	96
Rys. 7.19. Wykresy współrzędnych czynnikowych przypadków $t[1]$ (a) i $t[1]/t[2]$ (c) oraz wag $w^*[1]$ (b) i $w^*[1]/w^*[2]$ (d) modeli OSC PLS-DA-10-GR (a, b) i OSC PLS-DA-10-REF (c, d)	98
Rys. 7.20. Wykresy współrzędnych czynnikowych przypadków $t[1]$ modeli OSC PLS-DA-10-GR (a) i OSC PLS-DA-10-REF (b)	99
Rys. 7.21. Wykresy współrzędnych czynnikowych przypadków $t[1]$ (a) i (c) oraz wag $w^*[1]$ (b) i (d) modeli OSC PLS-DA-11-GR (a, b) i OSC PLS-DA-11-REF (c, d)	101
Rys. 7.22. Wykresy współrzędnych czynnikowych przypadków $t[1]/t[2]$ (a) i $t[1]$ (c) oraz wag $w^*[1]/w^*[2]$ (b) i $w^*[1]$ (d) modeli OSC PLS-DA-12-GR (a, b) i OSC PLS-DA-12-REF (c, d)	103
Rys. 7.23. Wykresy współrzędnych czynnikowych przypadków $t[1]/t[2]$ (a, c) oraz wag $w^*[1]/w^*[2]$ (b, d) modeli OSC PLS-DA-13-GR (a - b) i OSC PLS-DA-13-REF (c - d)	106
Rys. 7.24. Wykresy współrzędnych czynnikowych przypadków (a) oraz wag (b) modelu OSC PLS-DA-14	108
Rys. 7.25. Wyniki działania algorytmu BFS dla czterech wartości parametru „kara za cechę”. Rozróżnienie grup histopatologicznych (a), stan guza (b), wczesne / późne zmiany popromienne (c), operacja / brak operacji (d), chemioterapia / brak chemioterapii (e), stopień złośliwości guza (f)	130

12 Spis tabel

Tab. 7.1. Zestawienie dawek pochłoniętych dla badanej grupy pacjentów	55
Tab. 7.2. Charakterystyka jakości modelu PCA otrzymanego z analizy macierzy X_0 dla składowych PC o wartościach własnych (λ) > 1	59
Tab. 7.3. Charakterystyka jakości modelu PCA otrzymanego z analizy macierzy X dla składowych PC o wartościach własnych (λ) > 1	60
Tab. 7.4. Wyniki testów Kruskala-Wallisa (K-W) oraz U Manna-Whitneya (U M-W) dla rozkładów wartości współrzędnych czynnikowych przypadków otrzymanych w analizie PCA	65
Tab. 7.5. Liczby widm i klas uwzględnianych w danej analizie PLS-DA	68
Tab. 7.6. Charakterystyka jakości modelu PLS-DA-1	68
Tab. 7.7. Usuwanie z modelu PLS-DA-1 informacji niezwiązanej z danymi histopatologicznymi metodą filtrowania OSC	69
Tab. 7.8. Charakterystyka jakości modelu OSC PLS-DA-1	70
Tab. 7.9. Usuwanie z modelu PLS-DA-2 informacji niezwiązanej z danymi histopatologicznymi metodą filtrowania OSC, po wykluczeniu grup ASTR i GBM	71
Tab. 7.10. Charakterystyka jakości modelu OSC PLS-DA-2	71
Tab. 7.11. Wyniki testów Kruskala-Wallisa dla rozkładów wartości współrzędnych czynnikowych przypadków otrzymanych w analizach przeprowadzonych z uwzględnieniem danych histopatologicznych	72
Tab. 7.12. Charakterystyka jakości modelu PLS-DA-3	73
Tab. 7.13. Usuwanie z modelu PLS-DA-3 informacji niezwiązanej z danymi kontrolnymi	74
Tab. 7.14. Charakterystyka jakości modelu OSC PLS-DA-3	74
Tab. 7.15. Wyniki testów Kruskala-Wallisa dla rozkładów wartości współrzędnych czynnikowych przypadków otrzymanych w analizach bazy widm zarejestrowanych badań kontrolnych	76
Tab. 7.16. Usuwanie z modelu PLS-DA-4 informacji niezwiązanej z odpowiedzią metaboliczną na radioterapię	76
Tab. 7.17. Charakterystyka jakości modelu OSC PLS-DA-4	77
Tab. 7.18. Wyniki testu U Manna-Whitneya dla rozkładów wartości współrzędnych czynnikowych przypadków z grup wczesnych i późnych zmian popromiennych	78
Tab. 7.19. Charakterystyka jakości modelu PLS-DA-5	78
Tab. 7.20. Usuwanie z modelu PLS-DA-5 informacji niezwiązanej z odpowiedzią metaboliczną na resekcję guza	79
Tab. 7.21. Charakterystyka jakości modelu OSC PLS-DA-5	79
Tab. 7.22. Wyniki testu U Manna-Whitneya dla rozkładów wartości współrzędnych czynnikowych przypadków dla widm uzyskanych od pacjentów, u których przeprowadzono lub nie resekcję guza	80
Tab. 7.23. Usuwanie z modelu PLS-DA-6 informacji niezwiązanej z odpowiedzią metaboliczną na leczenie chemioterapią	80
Tab. 7.24. Charakterystyka jakości modelu OSC PLS-DA-6	81
Tab. 7.25. Wyniki testu t-Studenta dla rozkładów wartości współrzędnych czynnikowych przypadków dla widm uzyskanych od pacjentów, poddanych lub nie chemioterapii	82
Tab. 7.26. Charakterystyka jakości modelu PLS-DA-7	82

Tab. 7.27. Usuwanie z modelu PLS-DA-7 informacji niezwiązanej ze stopniem złośliwości nowotworu	83
Tab. 7.28. Charakterystyka jakości modelu OSC PLS-DA-7	83
Tab. 7.29. Wyniki testów Kruskala-Wallisa dla rozkładów wartości współrzędnych czynnikowych przypadków otrzymanych w analizach uwzględniających stopień złośliwości nowotworu	85
Tab. 7.30. Liczba widm (wraz z podziałem na klasy) uwzględnianych w danej analizie PLS-DA	92
Tab. 7.31. Charakterystyka jakości modeli OSC PLS-DA-8-GR i OSC PLS-DA-8-REF otrzymanych dla obu badanych lokalizacji	93
Tab. 7.32. Wyniki testów Kruskala-Wallisa dla rozkładów wartości współrzędnych czynnikowych przypadków otrzymanych w analizach uwzględniających dane histopatologiczne	94
Tab. 7.33. Charakterystyka jakości modeli OSC PLS-DA-9-GR i OSC PLS-DA-9-REF otrzymanych dla obu badanych lokalizacji	95
Tab. 7.34. Wyniki testów Kruskala-Wallisa dla rozkładów wartości współrzędnych czynnikowych przypadków otrzymanych w analizach uwzględniających informacje pochodzące z badań kontrolnych	97
Tab. 7.35. Charakterystyka jakości modeli OSC PLS-DA-10-GR i OSC PLS-DA-10-REF otrzymanych dla obu badanych lokalizacji	98
Tab. 7.36. Wyniki testów U Manna-Whitneya dla rozkładów wartości współrzędnych czynnikowych otrzymanych w analizach rozróżnienia wczesnych i późnych powikłań popromiennych	100
Tab. 7.37. Charakterystyka jakości modeli OSC PLS-DA-11-GR i OSC PLS-DA-11-REF otrzymanych dla obu badanych lokalizacji	100
Tab. 7.38. Wyniki testów U Manna-Whitneya dla rozkładów wartości współrzędnych czynnikowych przypadków otrzymanych w analizach uwzględniających informacje o resekcji guza	102
Tab. 7.39. Charakterystyka jakości modeli OSC PLS-DA-12-GR i OSC PLS-DA-12-REF otrzymanych dla obu badanych lokalizacji	102
Tab. 7.40. Wyniki testów U Manna-Whitneya dla rozkładów wartości współrzędnych czynnikowych przypadków otrzymanych w analizach uwzględniających zastosowanie chemioterapii	104
Tab. 7.41. Charakterystyka jakości modeli OSC PLS-DA-13-GR i OSC PLS-DA-13-REF otrzymanych dla obu badanych lokalizacji	105
Tab. 7.42. Wyniki testów Kruskala-Wallisa dla rozkładów wartości współrzędnych czynnikowych przypadków otrzymanych w analizach uwzględniających stopień złośliwości nowotworu	107
Tab. 7.43. Usuwanie z modelu OSC PLS-DA-14 informacji niezwiązanej z lokalizacją obszaru pomiarowego	108
Tab. 7.44. Charakterystyka jakości modelu OSC PLS-DA-14	108
Tab. 7.45. Wyniki testu t-Studenta dla rozkładów wartości współrzędnych czynnikowych otrzymanych w analizach uwzględniających lokalizację obszaru pomiarowego	109
Tab. 7.46. Podział przypadków zbioru uczącego na wewnętrzne podzbiory uczące (U), walidacyjne (W) i testowe (T) z uwzględnieniem liczebności zewnętrznych zbiorów testowych	118
Tab. 7.47. Zestawienie stałych parametrów uczenia perceptronów wielowarstwowych	119

Tab. 7.48. Wyniki redukcji wymiarów dla zbiorów uczących metodą PCA: liczba istotnych składowych głównych (PC) oraz procentowa wartość całkowitej wariancji wyjaśniona przez daną składową główną	121
Tab. 7.49. Charakterystyka sieci oraz wynik klasyfikacji grup histopatologicznych	122
Tab. 7.50. Charakterystyka sieci oraz wynik klasyfikacji grup wyznaczonych na podstawie badań kontrolnych	123
Tab. 7.51. Charakterystyka sieci oraz wynik klasyfikacji wczesnych i późnych powikłań po radioterapii	124
Tab. 7.52. Charakterystyka sieci oraz wynik klasyfikacji odpowiedzi tkanki mózdzku na przeprowadzoną resekcję guza	125
Tab. 7.53. Charakterystyka sieci oraz wynik klasyfikacji odpowiedzi tkanki mózdzku na zastosowanie chemioterapii	126
Tab. 7.54. Charakterystyka sieci oraz wynik klasyfikacji stopnia złośliwości nowotworu	127
Tab. 7.55. Porównanie poprawnych klasyfikacji dla poszczególnych sieci	128
Tab. 7.56. Charakterystyka sieci oraz wynik klasyfikacji grup histopatologicznych	131
Tab. 7.57. Charakterystyka sieci oraz wynik klasyfikacji grup wyznaczonych na podstawie badań kontrolnych	131
Tab. 7.58. Charakterystyka sieci oraz wynik klasyfikacji wczesnych i późnych powikłań po radioterapii	132
Tab. 7.59. Charakterystyka sieci oraz wynik klasyfikacji odpowiedzi tkanki mózdzku na przeprowadzoną resekcję guza	132
Tab. 7.60. Charakterystyka sieci oraz wynik klasyfikacji odpowiedzi tkanki mózdzku na zastosowanie chemioterapii	133
Tab. 7.61. Charakterystyka sieci oraz wynik klasyfikacji stopnia złośliwości nowotworu	133
Tab. 7.62. Zestawienie poprawnych klasyfikacji dla poszczególnych sieci	134
Tab. 7.63. Porównanie zdolności klasyfikacyjnych najlepszych sieci MLP dla dwóch metod redukcji wymiaru zmiennych wejściowych: PCA i BFS	135

13 Publikacje

Pattern Recognition Methods in ^1H MRS Monitoring In Vivo of Normal Appearing Cerebellar Tissue After Treatment of Posterior Fossa Tumors

Łukasz Boguszewicz, Sławomir Blamek, and Maria Sokół

Abstract The objective of this study was to investigate the metabolic responses of normal appearing cerebellar tissue after posterior fossa tumor treatment, and to identify characteristics of the particular treatment method. Moreover, this work examined the metabolic alterations of normal appearing tissue induced by a particular tumor state including resection, stagnation, progression, and recurrence. The studied group consisted of 29 patients treated for posterior fossa tumors. All of them were irradiated with a total dose of 54 Gy at 1.8 Gy/fraction (median values). In addition, 13 underwent chemotherapy, 25 underwent total tumor resection, 18 were tumor-free in control examinations, 5 had a stable disease, and tumor progression or recurrence was observed in 2 and 4 cases, respectively. The 69 spectra, acquired using a MRI/MRS 2T system, were analyzed using Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) with orthogonal signal correction (OSC) spectral filtering. A significantly elevated spectral region (0.97–1.55 ppm) was observed in patients after total resection in comparison to non-operated subjects. Patients treated with chemotherapy showed an elevated band between 1.15–1.75 and 2.7–3.0 ppm and had decreases in the remaining parts of the spectra. Increases in lactate and decreases in the remaining metabolites were characteristic for the tumor progression/recurrence group. Pattern recognition methods coupled with MRS revealed significant treatment-dependent alterations in normal appearing cerebellar tissue, as well as metabolic changes induced by tumor progression/recurrence.

Keywords Magnetic resonance spectroscopy • pattern recognition • brain tumor • treatment monitoring

Introduction

Central nervous system (CNS) tumors are some of the most frequent childhood malignancies and are characterized by a relatively high occurrence in the posterior fossa (19). Although treatment methods are consistently improving and have increased the long-term survival of those suffering from this condition, the treatment induced side effects are major limitations of many therapies. Besides the associated neurological and cognitive impairments (5), there is a higher risk of impairment in children who have undergone exclusive surgical treatment (1). Furthermore, there is often radiotherapy induced brain tissue necrosis (2) with additional necrosis developing after subsequent or adjuvant chemotherapy (12), as well as direct chemotherapy induced brain injury (3).

In vivo proton magnetic resonance spectroscopy (MRS) is a powerful and noninvasive tool for investigating metabolic changes in the intact brain (6). The MRS studies have revealed severe metabolic disturbances in low-dose irradiated adult brain tissue in comparison to the pre-treatment state (16). Similar observations have been made in the frontal lobe of children treated for posterior fossa tumors, where these disturbances were significantly altered after receiving chemotherapy (15). Previous work has demonstrated the usefulness of the pattern recognition (PR) analysis of in vivo ^1H spectra for the detection and characterization of brain tumors (4,11). In this study, we combined MRS and PR methods in order to investigate the response of normal appearing cerebellar tissue after posterior fossa tumor treatment, and to provide information on metabolic alterations characteristic for a particular treatment method. Furthermore, we examined the metabolic alterations of normal appearing tissue induced by the following tumor states: total resection, stagnation, progression, and recurrence.

Ł. Boguszewicz (✉)

Department of Medical Physics, Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology, Gliwice Branch, Wybrzeże Armii Krajowej 15, Gliwice 44-101, Poland
e-mail: lboguszewicz@io.gliwice.pl

S. Blamek

Department of Radiotherapy, Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology, Gliwice Branch, Wybrzeże Armii Krajowej, Gliwice 15, 44-101, Poland

M. Sokół

Department of Medical Physics, Center of Oncology, Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology, Gliwice Branch, Wybrzeże Armii Krajowej 15, Gliwice 44-101, Poland

Materials and Methods

Patients

The studied group consisted of 27 patients (with a median age of 16 years) treated for posterior fossa tumors. All patients were irradiated with a total dose of 54 or 55.5 Gy with a day fraction 1.8 or 1.5 Gy. In addition, 13 (48.2%) patients were treated with chemotherapy and 23 (85.2%) of them underwent total tumor resection. According to control examinations, the patients were divided into one of the four following groups: tumor free (16 cases – 59.3%), stagnation (5 cases – 18.5%), recurrence (4 cases – 14.8%), and progression (2 cases – 7.4%). Control examinations were performed from one to several times.

¹H NMR In Vivo

The 69 MRI localized in vivo ¹H MRS spectra were obtained using a 2T whole-body MRI/MRS system (Elscent Prestige, Haifa, Israel). The PRESS sequence was applied with the following parameters: TR = 1500 ms, TE = 35 ms, and 50 Acq. The volumes of interest of 1.5 × 1.5 × 1.5 cm³ were located contralaterally to the tumor or tumor site. The recording of the spectra was preceded by the automated global and local shimming procedures. Water suppression was achieved using CHESS techniques and no zero filling was applied. After a Fourier transformation and manual zero (and first, if necessary) order phase correction, the spectra were normalized in PeakFit 4.0 (by SPSS Inc., Chicago, USA). The spectra were normalized to the Cr peak to remove any relative shifts and analyzed in the range from 0.2 to 4.0 ppm.

Multivariate Analyses

The analyzed data gathered in the **X** matrix were composed of *k* spectra as rows and with columns of *n* = 929 spectral points representing chemical shifts. PLS-DA modelled the relations between the **X** and **Y** matrices, where **Y** was the (*k* × *j*) matrix containing information pertaining to group membership, and the number of columns (*j*) was equal to the number of groups. The relationship was expressed by means of score (latent) vectors. Geometrically, the **X** and **Y** matrices were understood as *k* points in two spaces with *n* and *j* axes. The PLS-DA modeling corresponded with hyper planes fit to both the **X** and **Y** data points and projected the matrices down on the hyper planes in such way so as to maximize the

covariance between the observation (spectra) positions on these hyper planes. The coordinates of this projection were the X- and Y-scores (18). Before the analyses, the NMR spectra were pre-processed using a spectral filter orthogonal signal correction (OSC) to improve the separation among groups. The OSC removed from the X variables the extraneous variance that was unrelated to Y, and the correction was made without removing information from X (17). The multivariate analyses were performed in SIMCA-P 11 Demo (Umetrics AB, Umeå, Sweden).

Results

In order to examine the data according to the influence of tumor resection on cerebellar tissue, the **X** data matrix was subjected to PLS-DA with OSC preprocessing. Figure 1a demonstrates a distinct separation between the spectra of non-operated patients and patients who underwent tumor resection. An interpretation of the scores plot was possible by comparing it with the X-weights plot (Fig. 1b), which displays each original variable (i.e. the chemical shift) as a single point. The further away a variable was from the plot origin, the greater was its influence on the distribution of the spectra along a given component of the scores plot. Figure 1a, b demonstrates a greatly elevated signal for mobile lipids and lactate (0.95–1.55 ppm) in post-operated patients.

Examining the influence of chemotherapy treatment resulted in a slightly worse clustering (Fig. 2a) than in the previous case, although both groups were distinguishable. X-weights plot (Fig. 2b) revealed a strongly elevated spectral range between 1.15 and 1.75 ppm, with maximum differences in the methylene lipids and a lactate peak at 1.3–1.33 ppm, as well as decreases in the remaining metabolites of the chemotherapy treated group. In patients without chemotherapy, strong increase of mobile lipids (0.9 ppm) and myo-inositol (3.65 ppm) were visible.

Metabolic alterations induced by the tumor state were clearly visible in Fig. 3a, b. Distinct clustering among the tumor-free state, stagnation, and progression/recurrence were observed (Fig. 3a). Interestingly, the two latter groups remained non-separated, which suggests that differences between them are much less important against the background of the other groups. Figure 3b shows markedly increased lactate signals in the progression/recurrence group with slightly decreased choline (3.2 ppm), NAA (2.02 ppm), and mI (3.65 ppm) signals, which were in direct opposition to the stagnation group. In addition, the tumor-free group was characterized by relatively higher mobile lipids levels at 0.9 ppm.

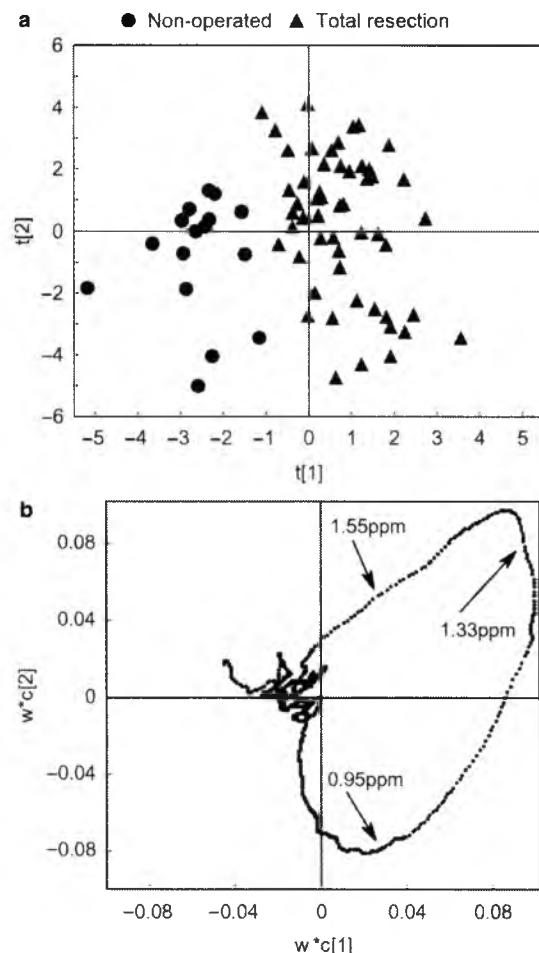


Fig. 1 PLS-DA scores plot (a) and corresponding X-weights plot (b) derived from the investigation of surgical influences on normal appearing tissue

Discussion

The combination of the in vivo ¹H MRS and pattern recognition methods have been effectively applied to differentiate between metabolic alterations induced by the specific treatment method, as well as tumor recurrence/progression or stagnation. The main advantage of this study was that the extracted discrimination features were clearly presented in graphical form and in terms of the original variables (the chemical shifts). Moreover, analyses were performed on the full spectra instead of metabolite proportions, thereby giving insight into the alterations of metabolites that are often omitted.

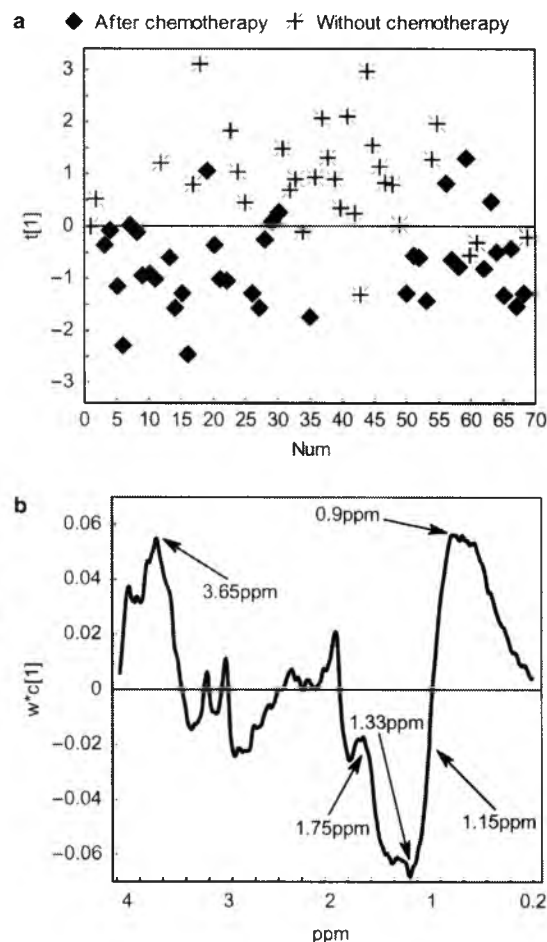


Fig. 2 PLS-DA scores plot (a) and corresponding X-weights plot (b) derived from the investigation of chemotherapy influences on normal appearing tissue

e.g. mobile lipids or lactate. The results obtained for the operated/non-operated group were comparable with other studies where increased Lip and Lac signals (in the ratio to NAA) were detected in the "normal brain" in non-irradiated patients who underwent tumor resection (7,13). The same ratios were markedly higher after receiving radiotherapy and were not dose-dependent (13). The authors suggested that the appearance of Lip signals in a normal appearing brain was caused by severe damage to the cell membranes. While the Lac signal could accumulate as a result of anaerobic glycolysis, hypoxia (13), or due to infiltration of tumor cells into the adjacent regions (7). However, the metabolic profile of patients treated with chemotherapy was less specific.

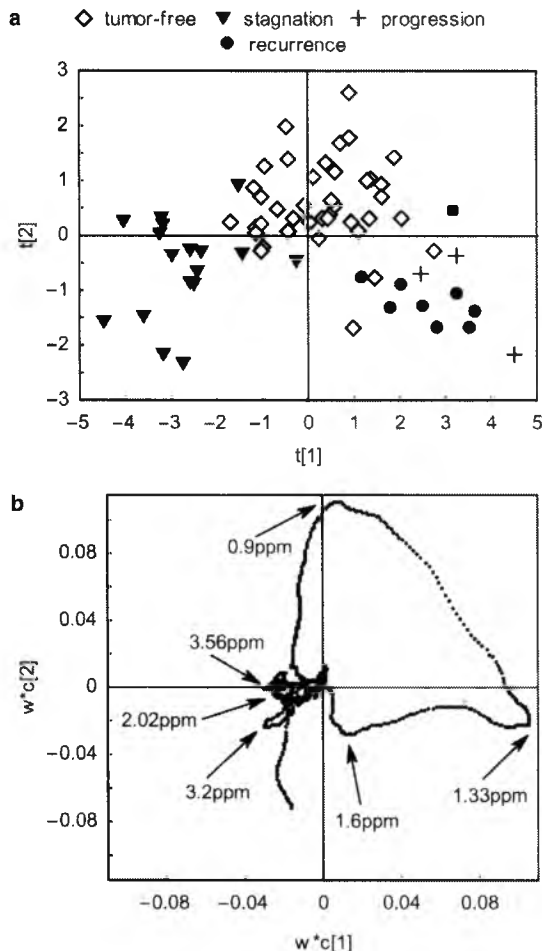


Fig. 3 PLS-DA scores plot (a) and corresponding X-weights plot (b) derived from the investigation of tumor state on normal appearing tissue

Moreover, publications examining the metabolic changes in a normal appearing brain due to chemotherapy are sparse and usually mobile lipids and lactate signals are excluded from the analyses (3,15). Nevertheless, some studies have focused on predicting resistance or responsiveness of non-irradiated tumor cells to chemotherapy. These findings indicate that the lipid (methylene) intensities were increased (1.3 ppm) and that the Cho resonance decreased as a treatment specific reaction resulting from apoptotic cell death (8,9). The strong difference in mI levels between the two groups was unclear, yet the increase of mI (in ratio to Cr) was observed in post-surgical irradiated patients who were not treated with chemotherapy and this was hypothesized to be

closely associated with local irradiation injury (16). Thus, there was an assumption that chemotherapy may act inversely to radiotherapy on mI levels. The second important aspect of tumor treatment is the prediction of treatment side effects. MRS has proved its usefulness as a reliable and reproducible prognostic marker that is capable of revealing a strong negative correlation between Lac/NAA ratio in patients treated for malignant gliomas and their survival rates (14). Another study proposed an increased ratio of lipid methylene (CH_2) to methyl (CH_3) signals as a possible recurrence marker (10). In addition, elevated Cho levels reflecting an increased membrane turnover as a result of inflammation and/or myelin breakdown are usually observed in tumor tissue. In this study, a slightly increased Cho signal was associated with the influence of a stable tumor in "normal tissue". Even though analyses were performed on one group of spectra, where several metabolic effects may overlap (e.g. influence of resection was studied after irradiation and chemotherapy), the usefulness of pattern recognition methods as an automatic tool for analyzing ^1H MRS spectra cannot be underestimated. In combination with OSC spectral filtering PLS-DA, these techniques were able to reveal subtle metabolic differences in normal appearing cerebellar tissue and assign them to a specific factor responsible for the observed alterations. Research supported by grant No. KBN 2P05E06829.

Conflict of interest statement We declare that we have no conflict of interest.

References

1. Beebe DW, Ris MD, Armstrong FD, Fontanesi J, Mulhern R, Holmes E, Wisoff JH (2005) Cognitive and adaptive outcome in low-grade pediatric cerebellar astrocytomas: evidence of diminished cognitive and adaptive functioning in national collaborative research studies (CCG 9891/POG 9130). *J Clin Oncol* 23:5198–5204
2. Chong Chong VFH, Khoo JBK, Chan LL, Rumpel H (2002) Neurological changes following radiation therapy for head and neck tumours. *Eur J Radiol* 44:120–129
3. Chu WC, Chik KW, Chan YL, Yeung DK, Roebuck DJ, Howard RG, Li CK, Metreweli C (2003) White matter and cerebral metabolite changes in children undergoing treatment for acute lymphoblastic leukemia: longitudinal study with MR imaging and ^1H MR spectroscopy. *Radiology* 229:659–669
4. Devos A, Lukas L, Suykens JAK, Vanhamme L, Tate AR, Howe FA, Majos C, Moreno-Torres A, van der Graaf M, Arus C, van Huffel S (2004) Classification of brain tumours using short echo time ^1H MR spectra. *J Magn Reson* 170(1):164–175
5. George AP, Kuehn SM, Vassilyadi M, Richards PMP, Parlow SE, Keene DL, Ventureyra ECG (2003) Cognitive sequelae in children with posterior fossa tumors. *Pediatr Neurol* 28:42–47
6. Gujar SK, Maheshwari S, Bjorkman-Burtscher I, Sundgren PC (2005) Magnetic Resonance Spectroscopy. *J Neuro-Ophthalmol* 25:217–226
7. Li X, Vigneron DB, Cha S, Graves EE, Crawford F, Chang SM, Nelson SJ (2005) Relationship of MR-derived lactate, mobile lipids, and relative blood volume for gliomas in vivo. *Am J Neuroradiol* 26:760–769

8. Lindskog M, Spenger C, Jarvet J, Graslund A, Kogner P (2004) Predicting resistance or response to chemotherapy by proton magnetic resonance spectroscopy in neuroblastoma. *J Natl Cancer Inst* 96:1457–1466
9. Lindskog M, Spenger C, Klason T, Jarvet J, Graslund A, Johnsen JI, Ponthan F, Douglas L, Nordell B, Kogner P (2005) Proton magnetic resonance spectroscopy in neuroblastoma: Current status, prospects and limitations. *Cancer Lett* 228:247–255
10. Matulewicz Ł, Sokół M, Wydmański J, Hawrylewicz L (2006) Could lipid CH₂/CH₃ analysis by in vivo ¹H MRS help in differentiation of tumor recurrence and post-radiation effects? *Folia Neuropathol* 44(2):116–124
11. Menze BH, Lichy MP, Bachert P, Kelm BM, Schlemmer HP, Hamprecht FA (2006) Optimal classification of long echo time in vivo magnetic resonance spectra in the detection of recurrent brain tumors. *NMR Biomed* 19:599–609
12. Ruben JD, Dally M, Bailey M, Smith R, McLean CA, Fedele P (2006) Cerebral radiation necrosis: incidence, outcomes, and risk factors with emphasis on radiation parameters and chemotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 65:499–508
13. Rutkowski T, Tarnawski R, Sokół M, Maciejewski B (2003) ¹H-MR spectroscopy of normal brain tissue before and after postoperative radiotherapy because of primary brain tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 56(5):1381–1389
14. Tarnawski R, Sokół M, Pieniążek P, Maciejewski B, Walecki J, Miszczyk L, Krupska T (2002) ¹H-MRS in vivo predicts the early treatment outcome of postoperative radiotherapy for malignant gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 52(5):1271–1276
15. Waldrop SM, Davis PC, Padgett CA, Shapiro MB, Morris R (1998) Treatment of brain tumors in children is associated with abnormal MR spectroscopic ratios in brain tissue remote from the tumor site. *Am J Neuroradiol* 19:963–970
16. Walecki J, Sokół M, Pieniążek P, Maciejewski B, Tarnawski R, Krupska T, Wydmański J, Brzeziński J, Grieb P (1999) Role of short TE ¹H-MR spectroscopy in monitoring of post-operation irradiated patients. *Eur J Radiol* 30:154–161
17. Wold S, Anttita H, Lindgren F, Öhman J (1998) Orthogonal signal correction of near-infrared spectra. *Chemom Intell Lab Sys* 44:175–185
18. Wold S, Sjostrom M, Eriksson L (2001) PLS-regression: a basic tool for chemometrics. *Chemom Intell Lab Sys* 58:109–130
19. Young G, Toretzky JA, Campbell AB, Eskenazi AE (2000) Recognition of common childhood malignancies. *Am Fam Physician* 61:2144–2154

Metabonomics Based on Pattern Recognition Methods in ¹H *in vivo* MRS in Differentiation Metabolic Profiles of Multiple Sclerosis Subtypes

L. Boguszewicz¹, M. Sokół¹, A. Polnik¹, and M. Maciejowski²

¹ Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology, Gliwice Branch, Gliwice, Poland

² Medical University in Katowice/Department of Neurology, Katowice, Poland

Abstract—Metabonomics based on pattern recognition methods was combined with ¹H *in vivo* MRS in order to investigate the metabolic differences in normal-appearing white matter of multiple sclerosis patients. The studied group consisted of 21 patients (12 – CIS, 7 – RR, 3 – PP, 2 – SP), the spectra were acquired using the whole body 2T MRI/MRS system and analyzed with Partial Least Squares – Discriminant Analysis preceded with Orthogonal Signal Correction spectral filtering.

The CIS class showed the highest NAA concentrations in comparison to clinically confirmed MS, and lower NAA as well as increased ml in CIS may suggest development of MS. Strongly elevated Lip was characteristic for RR, while increased Lac and probably ml as well as Glx distinguished SPMS. Surprisingly the PP class showed increased Ace and/or GABA.

Pattern recognition methods were effectively combined with ¹H *in vivo* MRS and revealed metabolic discriminative features between multiple sclerosis subtypes.

Keywords—Metabonomics, Pattern Recognition, ¹H *in vivo* MRS, Multiple Sclerosis, Clinically Isolated Syndrome.

I. INTRODUCTION

Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory CNS disease leading to focal myelin destruction based on several identified mechanisms. The ¹H *in vivo* MRS has been widely applied to identification of brain metabolic alterations in both demyelinating lesions and normal appearing brain tissue of MS patients [1-4]. Usually the increased choline (Cho) and decreased N-acetyl aspartate (NAA) signals are detected in enhancing lesions, and the increase of myo-inositol (ml) is often reported. The normal-appearing white matter (NAWM) shows decreased NAA. Despite the great usefulness of ¹H *in vivo* MRS in noninvasive investigation of brain metabolic alterations, statistical analysis of MR spectra is complicated and time-consuming, moreover the results are not always easily interpretable, especially when observed metabolic alterations need to be associated with a large group of pathologies or their clinical representations.

The metabonomic approach allows almost automatic analysis of unresolved MR spectra. Metabonomics based on pattern recognition methods has recently gained popularity in the field of *in vivo* MRS [5,6].

This work combines partial least squares – discriminant analysis (PLS-DA) [7] and orthogonal signal correction (OSC) [8] with the ¹H *in vivo* MRS in order to distinguish the four clinical representations of MS: clinically isolated syndrome (CIS), relapsing-remitting (RR), primary progressive (PR) and secondary progressive (SP).

II. MATERIALS AND METHODS

A. Patients

Twenty one patients were included into this study. Twelve with clinically confirmed MS and nine with CIS, however

Table 1 Characteristics of patients included into the study

	CIS	Relapsing-remitting (RR)	Primary progressive (PP)	Secondary progressive (SP)
Patients	9	7	3	2
Age (median)	28	29	38	52,5
Males	5	2	0	0
Females	4	5	3	2
EDSS (median)	1,5	2	6	6,75

majority of CIS patients showed lesions in MRI examinations. Clinical details of the studied group are presented in Table 1. Some patients were undergoing interferon or steroid treatment. No patients with current or recent relapses were included into the study.

B. ¹H *in vivo* MRS

Single-voxel localized ¹H *in vivo* MRS were performed using the whole body 2T MRI/MRS system (Elscent Prestige, Haifa, Israel). A PRESS sequence with following parameters was applied: TR/TE/Acq = 1500 ms/35 ms/50. The 84 spectra were acquired from the volumes of interest (VOI) of 1.5 × 1.5 × 1.5 cm³ located bilaterally in frontal

and paraventricular NAWM. The spectra recording procedure was preceded by the automated global and local shimming procedures. CHESS techniques were used to suppress the water signal. After Fourier transformation and manual zero (and if necessary first) order phase correction the spectra were normalized to 1 in the range of 0 – 4.2 ppm in PeakFit 4.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) and referenced to the Cr peak to remove any relative shifts. Sixteen spectra were excluded from the study due to contamination with demyelinating lesions.

Analyses were performed on spectral range of 0.2 – 4 ppm consisted of 929 spectral points (the chemical shifts).

C. Multivariate Analyses

The analyzed spectra formed rows of an **X** (68×929) matrix where each column corresponds to one spectral point. A dummy matrix **Y** was created to reflect the class membership of each spectrum according to the disease clinical representation. PLS-DA method with OSC spectral filtering was used to model the relation between matrices **X** and **Y**. The modelling leads to a linear transformation of the original data **X** into a new coordinate system:

$$\mathbf{T} = \mathbf{X}\mathbf{W}^* \quad (1)$$

where **W**^{*} is a **X**-weight matrix, whose columns {**w**₁, ..., **w**_m} are a set of the new orthogonal base vectors often called latent components. Vector **w**₁ is calculated as an eigenvector corresponding to the biggest eigenvalue of:

$$\mathbf{X}^T \tilde{\mathbf{Y}} \tilde{\mathbf{Y}}^T \mathbf{X} \mathbf{w}^* = \lambda \mathbf{w}^* \quad (2)$$

where:

$$\tilde{\mathbf{Y}} = \mathbf{Y} \left(\mathbf{Y}^T \mathbf{Y} \right)^{-\frac{1}{2}} \quad (3)$$

(assuming that **Y** matrix is normalized). To calculate the next **w**^{*} vector the **X** matrix is deflated:

$$\mathbf{E}_1 = \mathbf{X} - \mathbf{t}_1 \mathbf{p}_1^T \quad (4)$$

where:

$$\mathbf{p}_1 = \mathbf{X}^T \mathbf{t}_1 \left(\mathbf{t}_1^T \mathbf{t}_1 \right)^{-1} \quad (5)$$

and matrix **E**₁ replaces matrix **X** in equation 2. Resulted PLS-DA model is good approximation of both **X** and **Y**:

$$\mathbf{X} = \mathbf{T}\mathbf{P}^T + \mathbf{E} \quad (6)$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{T}\mathbf{C}^T + \mathbf{F} \quad (7)$$

where **C** is a **Y**-weight matrix while **E** and **F** are residual matrices. The relation between **X** and **Y** is reflected by the regression coefficients formed in matrix **B**:

$$\mathbf{Y} = \mathbf{X}\mathbf{W}^* \mathbf{C}^T + \mathbf{F} = \mathbf{X}\mathbf{B} + \mathbf{F} \quad (8)$$

The results are presented as a projection of the original data on the hyperplanes spread on **X**-weights (**w**^{*}) and vectors **t** (**X**-scores).

OSC is a spectral filter which removes extraneous (orthogonal to **Y**) variation from the original data without removing the essential information. The **t** vector explaining the greatest data **X** variance is orthogonalized to **Y**:

$$\mathbf{t}_1^{osc} = \left(\mathbf{I} - \mathbf{Y} \left(\mathbf{Y}^T \mathbf{Y} \right)^{-1} \mathbf{Y}^T \right) \mathbf{t}_1 \quad (9)$$

then vectors **w**₁^{osc} and **p**₁^{osc} are calculated from equations 2 and 5. Next the OSC component (**t**₁^{osc}**p**₁^{osc}) is subtracted from matrix **X**. The resulting **E**₁^{osc} matrix may be used as an input data for the PLS-DA.

The multivariate analyses were performed using SIMCA-P 12 Demo (Umetrics AB, Umeå, Sweden).

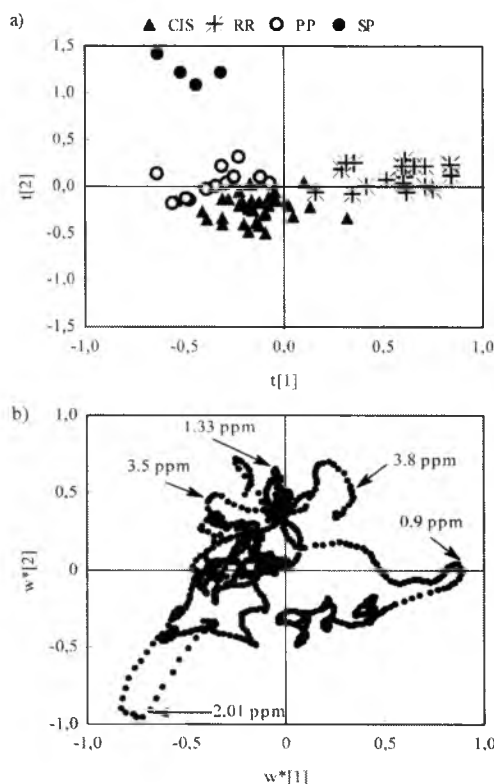


Fig. 1 PLS-DA scores (a) and X-weights (b) plots for the first two latent components

III. RESULTS

In order to evaluate metabolic differences between the particular MS clinical presentations the PLS-DA preceded with OSC was applied to the matrices X and Y . The analysis resulted in a 5-component model with $R^2X = 0.41$, $R^2Y = 0.91$ and $Q^2 = 0.79$ (explaining the X and Y variance as well as predictive ability of the model). Values close to 1 indicate better representation of the original data.

Fig. 1 presents the projection of the original data on a hyperplane spread on the two first latent components. The X -scores plot (Fig. 1a) shows a distinct clustering of all classes with a significant separation of the SPMS. The corresponding X -weights plot (Fig. 1b) reveals the metabolic disturbances responsible for the observed clustering. The SPMS, separated by the second component, is characterized by the increased lactate (Lac) band at 1.33 ppm and the strong decrease of NAA at 2.01 ppm in comparison to the remaining classes. Moreover, the increase of ml and glutamine-glutamate (Glx) in the elevated area between 3.5 – 3.8 ppm should be taken into account. The highest NAA level corresponds to the CIS class. The RRMS class is distinguished by the first component indicating the elevated mobile lipids (Lip) signals at 0.9 ppm. The PPMS class is not well distinguished by the two first components, however, including the third component into the projection hyperplane leads to the clear separation of the PPSM – the elevated signal at 1.9 ppm corresponding to acetate (Ace) or γ -aminobutyric acid (GABA) seems to be responsible for this separation (Fig. 2).

IV. DISCUSSION

Pattern recognition analysis of 1H *in vivo* MRS spectra enables the MS clinical representations to be effectively distinguished. The obtained results are presented in a graphical form allowing fast and accurate interpretation. The three first latent components were sufficient to achieve the desired result.

Although the CIS does not determine MS, an occurrence of MRI visible lesions highly increases the risk of the MS development. The PLS-DA model revealed the higher NAA levels in the CIS patients than in the MS ones. Decrease of NAA reflects neuronal loss and has been reported in CIS and MS NAWM [2,9], however this decrease is more prominent in advanced MS [2,10]. Furthermore, the simultaneous increase of ml, reflecting glial proliferation, may suggest development of MS [2,9]. In the CIS spectra located in the vicinity of the plot's origin the trends towards the higher ml and lower NAA levels may be observed (Fig. 1 and 2), thus the mixing of some of the

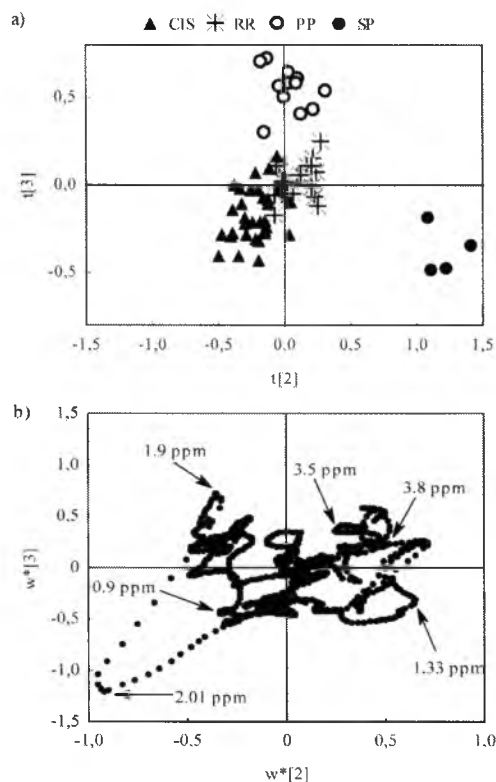


Fig. 2 PLS-DA scores (a) and X-weights (b) plots for the second and third latent components

CIS spectra with the RR and PP classes may suggest MS in these cases.

RR is the most common form of MS, accounting for approximately 40 – 55 % of all MS cases, frequently showing numerous inflammatory lesions. The obtained PLS-DA model showed the marked increase of the Lip signals at 0.9 ppm in the RR in comparison to the remaining classes. Apart from decreased NAA as well as increased ml and Cho, the Lip signals are present in acute and chronic inflammatory lesions [1,10,12,13] and also appear in NAWM [10,13]. The appearance of the Lip signals is associated with myelin breakdown.

In majority of cases RR develops into SPMS. SPMS is characterized by a gradual worsening of the symptoms, which leads to a constant neurological damage. According to the obtained PLS-DA model the main factors responsible for the SPMS identification are the strong Lac signal, as

well as the decrease of NAA. Similarly to Lip, Lac is not observed in normal brain, and its occurrence in MS patients is associated with inflammation [12]. The latter is the cause of relapses in RRMS – the inflammatory activity of macrophages is mainly visible in acute lesions and in the lesser degree, in NAWM. In the progressive phase, due to severe cell membrane disruption and blood-brain barrier breakdown, inflammation spreads all over the brain [14,15]. While the NAA lowering is widely reported in SPMS NAWM [3,4,10], the papers reporting significant increase of Lac are sparse. However, the analyses of cerebrospinal fluid in the SM patients revealed the strongly increased Lac concentrations in SPMS as compared to RRMS [16].

PPMS has its origin in spinal cord and migrates into the brain with time. The symptoms gradually progress from the disease onset without relapses and remissions. PP patients constitute approximately 10 – 15 % of all MS patients. Despite the less inflammation in PP, the observed injury to NAWM is similar as in SPMS [13,14]. The decreased NAA and Cho levels in PPMS NAWM as compared to controls have been reported [17,18], but no clear distinction between PP and SPMS has been found [18]. Our PLS-DA model successfully distinguished the PP class on the basis of the increased signal at 1.9 ppm originating from Ace or GABA. The elevated Ace has been reported in RRMS which has been explained as resulting from an altered metabolism of the products of NAA hydrolysis and/or reduced utilization of acetate [19], however, there is no evidence in literature supporting this observation. On the other hand the increase of GABA may be a result of GABAergic drug treatment.

V. CONCLUSIONS

Metabonomic analysis of the ^1H in vivo MRS spectra allows differentiating various MS clinical representations. Such an approach, combining the MR spectroscopic analysis with the pattern recognition methods, enables the extracted discriminative features to be expressed in terms of the original variables (the chemical shifts) and presented in a clear graphical form, additionally permitting automation of the whole process.

Pattern recognition models built on a large group of patients may be helpful in clinical diagnosis.

REFERENCES

1. Mader I, Roser W, Kappos L, et al (2000) Serial proton MR spectroscopy of contrast-enhancing multiple sclerosis plaques: absolute metabolic values over 2 years during a clinical pharmacological study. *Am J Neuroradiol* 21(7):1220-1227
2. Wattjes MP, Harzheim M, Lutterbey GG et al (2007) Axonal damage but no increased glial cell activity in the normal-appearing white matter of patients with clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis using high-field magnetic resonance spectroscopy. *Am J Neuroradiol* (8):1517-1522 DOI 10.3174/ajnr.A0594
3. Gustafsson MC, Dahlqvist O, Jaworski J et al (2007) Low choline concentrations in normal-appearing white matter of patients with multiple sclerosis and normal MR imaging brain scans. *Am J Neuroradiol* 28(7):1306-1312 DOI 10.3174/ajnr.A0580
4. Sarchielli P, Presciutti O, Pelliccioli GP et al (1999) Absolute quantification of brain metabolites by proton magnetic resonance spectroscopy in normal-appearing white matter of multiple sclerosis patients. *Brain* 122(3):513-521
5. Tate AR, Underwood J, Acosta DM, et al (2007) Development of a decision support system for diagnosis and grading of brain tumours using in vivo magnetic resonance single voxel spectra. *NMR Biomed* 19:411-434
6. Opstad KS, Ladroue C, Bell BA et al (2007) Linear discriminant analysis of brain tumour ^1H MR spectra: a comparison of classification using whole spectra versus metabolite quantification. *NMR Biomed* 20(8):763-770
7. Barker, M; Rayens, W (2003) Partial least squares for discrimination. *J Chemom* 17:166–173 DOI: 10.1002/cem.785
8. S. Wold, H. Anttia, F. Lindgren, et al (1998) Orthogonal signal correction of near-infrared spectra. *Chemom Intell Lab Sys* 44:175-185 DOI 10.1016/S0169-7439(98)00109-9
9. Fernando KT, McLean MA, Chard DT, et al (2004) Elevated white matter myo-inositol in clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis. *Brain* 127(6):1361-1369 DOI 10.1093/brain/awh153
10. Tourbah A, Stievenart JL, Gout O, et al (1999) Localized proton magnetic resonance spectroscopy in relapsing remitting versus secondary progressive multiple sclerosis. *Neurology* 53(5):1091-1097
11. Kapeller P, Brex PA, Chard D, et al (2002) Quantitative ^1H MRS imaging 14 years after presenting with a clinically isolated syndrome suggestive of multiple sclerosis. *Mult Scler* 8(3):207-210 DOI 10.1191/1352458502ms822oa
12. Bitsch A, Bruhn H, Vougioukas V, et al (1999) Inflammatory CNS demyelination: histopathologic correlation with in vivo quantitative proton MR spectroscopy. *Am J Neuroradiol* 20(9):1619-1627
13. Narayana PA (2005) Magnetic resonance spectroscopy in the monitoring of multiple sclerosis. *J Neuroimaging*. 15(4):46S-57S DOI 10.1177/1051228405284200
14. Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, et al (2005) Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain* 128(11):2705-2712 DOI 10.1093/brain/awh641
15. Rocca MA, Mondria T, Valsasina P, et al (2007) A three-year study of brain atrophy after autologous hematopoietic stem cell transplantation in rapidly evolving secondary progressive multiple sclerosis. *Am J Neuroradiol* 28(9):1659-1661 DOI 10.3174/ajnr.A0644
16. Jongen P, Lamers K, Doesburg W, et al (1997) Cerebrospinal fluid analysis differentiates between relapsing-remitting and secondary progressive multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 63(4):446-451
17. Sijens PE, Mostert JP, Oudkerk M, et al (2006) ^1H MR spectroscopy of the brain in multiple sclerosis subtypes with analysis of the metabolite concentrations in gray and white matter: initial findings. *Eur Radiol*. 16(2):489-495
18. Cucurella MG, Rovira A, Rio J, et al (2000) Proton magnetic resonance spectroscopy in primary and secondary progressive multiple sclerosis. *NMR Biomed*. 13(2):57-63
19. Sharma R, Yu H, Wolinsky J, et al (2000) Acetate Metabolism is Altered in Some Multiple Sclerosis Plaques. *Proc. Intl. Sot. Mag. Reson. Med* 8